

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-530087

(P2002-530087A)

(43) 公表日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

ページ* (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/15

4 B 0 2 4

1/15

1/19

4 B 0 5 0

1/19

1/21

4 B 0 6 4

1/21

9/10

4 B 0 6 5

5/10

C 1 2 P 19/28

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 140 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-582584(P2000-582584)

(86) (22) 出願日 平成11年11月18日 (1999.11.18)

(85) 翻訳文提出日 平成13年5月18日 (2001.5.18)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 7 5 9 9

(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 9 6 0 3

(87) 国際公開日 平成12年5月25日 (2000.5.25)

(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 0 9 , 0 3 1

(32) 優先日 平成10年11月18日 (1998.11.18)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 0 9 , 0 9 6

(32) 優先日 平成10年11月19日 (1998.11.19)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ネオーズ テクノロジーズ, インコーポ
レイテッド

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19044,
ホーシャム, ウィットマー ロード
102

(72) 発明者 デフリース, シャウン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19454,
ノース ウェールズ, フィリー ドラ
イブ 126

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴ糖の安価な産生

(57) 【要約】

本発明は、糖類の産物の酵素合成のために有用である、
組換え細胞、反応混合物、および方法を提供する。この
組換え細胞は、グリコシルトランスフェラーゼをコード
する異種遺伝子を含む。グリコシルトランスフェラーゼ
は、酵素合成の少なくとも1つの工程、およびグリコシ
ルトランスフェラーゼに対する基質として役立ち得るヌ
クレオチド糖についての系を触媒する。この組換え細
胞、反応混合物、および方法は、多糖、オリゴ糖、糖タ
ンパク質および糖脂質を含む、広範な種々の糖類を、安
価な出発物質を用いて、効率的に合成するために有用で
ある。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖類の産物を産生するための反応混合物であって、ここで該反応混合物は、アクセプター糖類、および第1の型の植物細胞または微生物細胞を含み、該第1の型の植物細胞または微生物細胞は、以下：

a) ヌクレオチド糖、およびb) 該ヌクレオチド糖から該アクセプター糖類への糖の移行を触媒して、該糖類の産物を形成する第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、
を産生する、反応混合物。

【請求項2】 前記細胞が、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、および植物細胞からなる群の1つ以上から選択される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項3】 前記細胞が、透過化処理されるか、さもなければ分裂される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項4】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、フコシルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、GDP-フコースである、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項5】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアル酸である、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項6】 前記ヌクレオチド糖が、UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-グルクロン酸、UDP-GalNAc、UDP-ガラクトン酸、GDP-マンノースからなる群より選択される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項7】 前記第1の型の細胞が、野生型細胞と比較して上昇したレベルで前記ヌクレオチド糖を産生する、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項8】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類中に該ヌクレオチド糖を取り込む該細胞の能力の欠損から生じる、請求項7に記載の反応混合物。

【請求項9】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記野生型細胞により産生されるヌクレオチド糖のレベルより、少なくとも10%高い、請求項7に記載の反応混合物。

【請求項10】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記野生型細胞により産生されるヌクレオチド糖のレベルより、少なくとも25%高い、請求項9に記載の反応混合物。

【請求項11】 前記ヌクレオチド糖が、異種遺伝子から発現される1つ以上の酵素を含む酵素経路により合成される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項12】 前記組換えグルコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアル酸であり、そして前記異種遺伝子が、CMP-シアル酸シンターゼをコードする、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項13】 前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、そして前記糖類の産物が、シアリルラクトースである、請求項12に記載の反応混合物。

【請求項14】 前記組換えグルコシルトランスフェラーゼが、 β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、UDP-GalNAcである、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項15】 前記アクセプターが、ラクトースであり、そして前記糖類の産物が、 β 1, 4-GalNAc-ラクトースである、請求項14に記載の反応混合物。

【請求項16】 前記組換えグルコシルトランスフェラーゼが、グルコシルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、UDP-Galである、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項17】 前記グルコシルトランスフェラーゼが、 α 1, 3-グルコシルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、末端 α 1, 3連結ガラクトース残基を含む、請求項16に記載の反応混合物。

【請求項18】 前記酵素経路が、完全または一部の糖ヌクレオチド再生サイクルを含む、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項19】 請求項18に記載の反応混合物であって、ここで前記ヌクレオチド糖が、UDP-GalNAcであり、そして前記糖ヌクレオチド再生サイクルが、以下：

UDP-GalNAcエピメラーゼ、UDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ

、GlcNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、およびピルビン酸キナーゼ；ならびに

UDP-GalNAcピロホスホリラーゼ、GlcNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、

からなる群より選択されるセットの酵素を含む、反応混合物。

【請求項20】 前記反応混合物が、前記糖ヌクレオチド再生サイクルに対する基質として用いられるヌクレオチドを産生する第2の細胞型をさらに含む、請求項19に記載の反応混合物。

【請求項21】 前記第2の細胞型が、前記ヌクレオチドの合成を触媒するヌクレオチドシンセターゼポリペプチドをコードする外因性遺伝子を含む、請求項20に記載の反応混合物。

【請求項22】 前記第1の細胞型が、以下：

a) 3'-シアリルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド、およびCMP-シアル酸シンセターゼ活性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質；ならびに

b) GlcNAcからのシアル酸の合成を触媒する酵素、

をコードする外因性遺伝子を含み；

そして前記第2の細胞型が、CMP-シンセターゼをコードする外因性遺伝子を含む、請求項21に記載の反応混合物。

【請求項23】 前記第1の細胞型が、E. coliであり、そして該第2の細胞型が、酵母またはCorynebacteriumである、請求項21に記載の反応混合物。

【請求項24】 前記第1の型の細胞が、前記ヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒して、さらなるグリコシル化した糖類の産物を形成する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼを産生する、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項25】 前記ヌクレオチド糖が、UDP-Galであり、前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 α

1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項24に記載の反応混合物。

【請求項26】 請求項25に記載の反応混合物であって、ここで前記アセブター糖類が、 $\text{Glc(R)}\cdot\beta\text{-O-R}^1$ であり、ここで R^1 は、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-COX}$ であり；Xは、OH、 OR^2 、 $-\text{NHNH}_2$ からなる群より選択され、RはOH、またはNAcであり； R^2 は、水素、糖類、オリゴ糖、または少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基、そしてnは、2～18の整数である、反応混合物。

【請求項27】 前記UDP-Galが、UDP-Gal4' エピメラーゼおよびUDP-Glcピロホスホリラーゼをコードする外因性遺伝子から発現される酵素により産生される、請求項25に記載の反応混合物。

【請求項28】 請求項1に記載の反応混合物であって、ここで前記細胞が、以下：

a) 少なくとも第2のヌクレオチド糖を産生するための酵素系、およびb) 該第2のヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒する少なくとも第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、
をさらに含む、反応混合物。

【請求項29】 請求項28の反応混合物であって、ここで以下：
前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼがGlcNAcトランスフェラーゼであり、そして前記第1のヌクレオチド糖がUDP-GlcNAcであり；
そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2のヌクレオチド糖が、UDP-ガラクトースである、反応混合物。

【請求項30】 前記反応混合物が、シクトーN-ネオテトラオース(LNnT)を形成する、請求項29に記載の反応混合物。

【請求項31】 前記反応混合物がまた、以下：

a) 第2のヌクレオチド糖、および
b) 該第2のヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、

を産生する、少なくとも第2の型の細胞を含む、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項32】 前記第1のグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2のグリコシルトランスフェラーゼが、GalNAcトランスフェラーゼである、請求項31に記載の反応混合物。

【請求項33】 請求項31の反応混合物であって、ここで以下：
前記第1の細胞型が、組換え β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼ、組換え β 1, 4-Galトランスフェラーゼ、UDP-GalNAc、およびUDP-Galを含み；そして前記第2の細胞型が、組換え α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼおよびCMP-シアリ酸を含む、反応混合物。

【請求項34】 前記CMP-シアリ酸が、組換え酵素CMP-シアリ酸シンセターゼ、GlcNAcエピメラーゼ、NeuAcアルドラーゼ、およびCMP-シンセターゼを含む、前記第2の細胞型における酵素系により、CTPおよびGlcNAcから産生される、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項35】 前記アクセプター糖類が、ラクトシルセラミドまたはリソラクトシルセラミドであり、そして糖類の産物がガングリオシドGM₂である、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項36】 前記第2の細胞型が、組換え α 2, 8-シアリルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項37】 前記アクセプターが、ラクトシルセラミド、またはリソラクトシルセラミドであり、そして前記糖類の産物が、GD₂である、請求項36に記載の反応混合物。

【請求項38】 前記反応混合物がまた、前記第1の型の細胞により産生される、前記ヌクレオチド糖から合成されるヌクレオチドを産生する、第2の型の細胞を含む、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項39】 請求項38に記載の反応混合物であって、ここで前記第2の細胞型により産生されるヌクレオチドおよび対応するヌクレオチド糖が、以下：

UTP: UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-グルクロン酸、またはUDP-ガラクツロン酸；

GTP:GDP-Fuc;および

CTP:CMP-シアル酸、

からなる群より選択される、反応混合物。

【請求項40】 糖類の産物を産生する細胞であって、ここで該細胞は、以下:

a) グリコシルトランスフェラーゼをコードする組換え遺伝子;

b) 該グリコシルトランスフェラーゼに対する基質であるヌクレオチド糖を形成するための酵素系;および

c) 外因性糖類アクセプター部分;

を含み、

ここで該グリコシルトランスフェラーゼは、該ヌクレオチド糖から該アクセプター部分への移行を触媒して、該糖類の産物を産生する、細胞。

【請求項41】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、該ヌクレオチド糖を再生するためのサイクル酵素を含む、請求項40に記載の細胞。

【請求項42】 グリコシルトランスフェラーゼをコードする前記組換え遺伝子が、異種遺伝子である、請求項40に記載の細胞。

【請求項43】 前記細胞が、野生型細胞と比較して上昇したレベルで前記ヌクレオチド糖を形成する、請求項40に記載の細胞。

【請求項44】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類へと該ヌクレオチド糖を取り込む細胞の能力の欠損から生じる、請求項43に記載の細胞。

【請求項45】 前記欠損が、多糖類グリコシルトランスフェラーゼ活性の減少したレベルによるものである、請求項44に記載の細胞。

【請求項46】 前記糖類の産物が、少なくとも約1mMの濃度で産生される、請求項40に記載の細胞。

【請求項47】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、異種遺伝子によりコードされる酵素を含む、請求項40に記載の細胞。

【請求項48】 請求項47に記載の細胞であって、ここで前記異種遺伝子によりコードされる酵素が、以下:

GDP-マンノースデヒドロターゼ、GDP-マンノース3, 5-エピメラーゼ、およびGDP-マンノース4-レダクターゼ；
UDP-ガラクトース4' エピメラーゼ；
UDP-GalNAc 4' エピメラーゼ；
CMP-シアル酸シンセターゼ；
UDP-Glcピロホスホリラーゼ、UDP-Galピロホスホリラーゼ、UDP-GalNAcピロホスホリラーゼ、GDP-マンノースピロホスホリラーゼ、およびUDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ；からなる群より選択される、ピロホスホリラーゼ；
ミオキナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、アセチルキナーゼ、クレアチンキナーゼからなる群より選択される、キナーゼ；
UDP-Glcアヒドロゲナーゼ、UDP-Galアヒドロゲナーゼ；および
ビルビン酸デカルボキシラーゼ、
の1つ以上である、細胞。

【請求項49】 前記ヌクレオチド糖が、GDP-フコースである、請求項48に記載の細胞。

【請求項50】 硫酸化多糖類を産生する細胞であって、ここで該細胞は、スルホトランスフェラーゼをコードする異種遺伝子；およびPAPSを産生する酵素系を含む、細胞。

【請求項51】 前記硫酸化多糖類が、ヘパリン硫酸、およびカラゲニンからなる群より選択される、請求項50に記載の細胞。

【請求項52】 PAPSを産生する前記酵素系が、外因性遺伝子から発現される1つ以上の酵素を含む、請求項50に記載の細胞。

【請求項53】 糖類の産物を産生する方法であって、ここで該方法は微生物細胞または植物細胞をアクセプター糖類と接触させる工程を包含し、ここで該細胞は、以下：

- a) ヌクレオチド糖を形成するための酵素系；および
- b) 該ヌクレオチド糖から該アクセプター糖類への糖の移行を触媒して、糖類の産物を産生する、組換えグリコシルトランスフェラーゼ、

を含む、方法。

【請求項54】 前記グリコシルトランスフェラーゼが異種遺伝子によりコードされる、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、前記細胞に外因性である遺伝子によりコードされ、かつ細胞野生型と比較して上昇したレベルで前記細胞により産生される、請求項53に記載の方法。

【請求項56】 前記糖類の産物が、少なくとも約1 mMの濃度で産生される、請求項53に記載の方法。

【請求項57】 前記細胞が、透過処理される、請求項53に記載の方法。

【請求項58】 前記細胞が、インタクトな細胞である、請求項53に記載の方法。

【請求項59】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、異種遺伝子によりコードされる酵素を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項60】 請求項59に記載の方法であって、ここで前記異種遺伝子によりコードされる酵素が、以下：

GDP-マンノースデヒドラターゼ、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース3, 5-エピメラーゼ、およびGDP-4-ケト-6-デオキシ-L-グルコース4-レダクターゼ；

UDP-ガラクトース4' エピメラーゼ；

UDP-GalNAc 4' エピメラーゼ；

CMP-シアル酸シンセターゼ；

UDP-Glcピロホスホリラーゼ、UDP-Galピロホスホリラーゼ、UDP-GalNAcピロホスホリラーゼ、GDP-マンノースピロホスホリラーゼ、およびUDP-GlcNAcピロホスホリラーゼからなる群より選択される、ピロホスホリラーゼ；ミコキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、アセチルキナーゼ、クレアチンキナーゼからなる群より選択される、キナーゼ；

UDP-Glcデヒドロゲナーゼ、UDP-Galデヒドロゲナーゼ；ならびにピルビン酸デカルボキシラーゼ、

の1つ以上である、方法。

【請求項61】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素、およびグリコシルトランスフェラーゼが、融合タンパク質として発現される、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 前記融合タンパク質が、CMP-シアル酸シンセターゼ活性、およびシアリルトランスフェラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】 前記融合タンパク質が、ガラクトシルトランスフェラーゼ活性、およびUDP-Gal4' エピメラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項64】 前記融合タンパク質が、GalNAcトランスフェラーゼ活性、およびUDP-GlcNAc4' エピメラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項65】 前記ヌクレオチド糖が、GDP-フコースであり、そして前記グリコシルトランスフェラーゼが、フコシルトランスフェラーゼである、請求項53に記載の方法。

【請求項66】 前記細胞が、野生型と比較して上昇したレベルで、ヌクレオチド糖を形成する、請求項53に記載の方法。

【請求項67】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類中へ該ヌクレオチド糖を取り込む該細胞の能力の欠損から生じる、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記欠損が、多糖類グリコシルトランスフェラーゼ活性の減少したレベルによるものである、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 請求項53に記載される方法であって、ここで前記細胞／ヌクレオチド糖が、以下：

Azotobacter vinelandii / GDP-Man ;

Pseudomonas 種 / UDP-Glc、および GDP-Man ;

Rhizobium 種 / UDP-Glc、UDP-Gal、GDP-Man ;

Erwinia 種 / UDP-Gal、UDP-Glc ;

Escherichia 種 / UDP-GlcNAc、UDP-Gal、CMP-

NeuAc、GDP-Fuc；

*Klebsiella*種/UDP-Gal、UDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-GlcNAc；

Hansenula jadinii/GDP-Man、GDP-Fuc；

Candida famata/UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc；

Saccharomyces cerevisiae/UDP-Glc、UDP-Gal、GDP-Man、GDP-GlcNAc；および

X. campestris/UDP-Glc、GDP-Man、

からなる群より選択される、方法。

【請求項70】 前記細胞が、*Azotobacter Vinelandii*であり、前記ヌクレオチド糖が、GDP-マンノースであり、前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、前記グリコシルトランスフェラーゼが、マンノシルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、マンノシルラクトースである、請求項53に記載の方法。

【請求項71】 前記細胞が、*E. coli*であり、前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアル酸であり、前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、前記グリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、シアリルラクトースである、請求項53に記載の方法。

【請求項72】 ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連する化合物についての糖類骨格を合成するための方法であって、ここで該方法は、末端グルクロン酸またはGlcNAc残基を含むアクセプター糖類と、反応混合物とを接触させる工程であって、ここで該反応混合物は、以下：

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

a) UDP-GlcNAcを形成するための酵素系；および

b) 該UDP-GlcNAcから該アクセプター糖類上の末端グルクロン酸へのUDP-GlcNAcの移行を触媒して、末端GlcNAc残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；ならびに

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

- a) UDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；および
 - b) 該UDP-グルクロン酸から該アクセプター糖類上の末端GlcNAc残基へのグルクロン酸の移行を触媒して、末端グルクロン酸残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ；
- を含む、工程、ならびに
該反応を、該糖類骨格が合成されるまで続けさせる工程、
を包含する、方法。

【請求項73】 請求項72に記載の方法であって、ここで前記反応混合物が、以下：

- a) UDP-GlcNAcおよびUDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；
 - b) 組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；および
 - c) 組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ、
- を含む単一の細胞型を含む、方法。

【請求項74】 請求項72に記載の方法であって、ここでUDP-GlcNAcおよび組換えGlcNAcトランスフェラーゼを形成するための前記酵素系が、第1の細胞型にあり、そしてUDP-グルクロン酸および組換えグルクロン酸トランスフェラーゼを形成するための前記酵素系が、第2の細胞型にある、方法。

【請求項75】 UDP-GlcNAcおよびUDP-グルクロン酸を産生するためのいずれかまたは両方の前記酵素系が、完全なまたは一部の糖ヌクレオチド再生サイクルを含む、請求項72に記載の方法。

【請求項76】 ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連する化合物を合成するための方法であって、ここで該方法は、ヘパリン多糖類骨格と、微生物細胞または植物細胞を含む反応混合物とを接触させる工程を包含し、該微生物細胞または植物細胞は、以下：

- a) PAPSを形成するための酵素系；および
- b) 該PAPSから該ヘパラン多糖類骨格への硫酸を移行を触媒して、N-硫酸化多糖類を産生する、組換えスルホトランスフェラーゼ、

を含む、方法。

【請求項77】 PAPSを形成するための前記酵素系が、PAPSサイクルを包含する、請求項76に記載の方法。

【請求項78】 請求項76に記載の方法であって、ここで該方法が、前記N-硫酸化多糖類と、グルクロン酸5'-エピメラーゼとを接触させて、前記多糖類骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基をイズロン酸へと転換する工程を含む、方法。

【請求項79】 前記グルクロン酸5'-エピメラーゼが、該グルクロン酸5'-エピメラーゼをコードする遺伝子を含む前記反応混合物に存在する細胞により発現される、請求項78に記載の方法。

【請求項80】 請求項78に記載の方法であって、ここで該方法は、前記イズロン酸含有N-硫酸化多糖類と、1つ以上のO-スルホニルトランスフェラーゼとを接触させて、ヘパラン硫酸を形成する工程をさらに含む、方法。

【請求項81】 請求項80に記載の方法であって、ここで前記O-スルホニルトランスフェラーゼが、O-スルホニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む、前記反応混合物に存在する細胞により発現される、方法。

【請求項82】 前記O-スルホニルトランスフェラーゼを発現する前記細胞が、PAPSを形成するための酵素系をさらに含む、請求項81に記載の方法。

【請求項83】 請求項76に記載の方法であって、ここで前記ヘパジン多糖類骨格が、以下：

末端グルクロン酸またはGlcNAc残基を含むアクセプター糖類と、反応混合物とを接触させる工程であって、ここで該反応混合物は、以下：

1) 以下を含む微生物細胞または植物細胞：

a) UDP-GlcNAcを形成するための酵素系；および

b) 該UDP-GlcNAcから該アクセプター糖類上の末端グルクロン酸へのGlcNAcの移行を触媒して、末端GlcNAc残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；ならびに

2) 以下を含む微生物細胞または植物細胞：

a) UDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；および

b) 該UDP-グルクロン酸から該アクセプター糖類上の末端GlcNAc残基へのグルクロン酸の移行を触媒して、末端グルクロン酸残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ；
を含む、工程、ならびに
該反応を、該糖類骨格が合成されるまで続けさせる工程、
を包含する、方法によって得られる、方法。

【請求項84】 請求項72に記載の方法であって、ここで該方法が、ヘパラン多糖類骨格を塩基で処理し、そしてヘパラン多糖類骨格を化学的に硫酸化して、N-硫酸化ヘパラン多糖類骨格を形成する、工程をさらに含む、方法。

【請求項85】 請求項84に記載の方法であって、ここで該方法は、前記N-硫酸化多糖類と、グルクロン酸5'-エピメラーゼとを接触させて、前記多糖類骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基を、イズロン酸へと転換する工程をさらに含む、方法。

【請求項86】 請求項85に記載の方法であって、ここで該方法は、前記イズロン酸含有N-硫酸化多糖類を、1つ以上のO-スルホトランスフェラーゼと接触させて、ヘパラン硫酸を形成する工程をさらに含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、糖類（オリゴ糖を含む）製品の酵素的合成に関する。特に、本発明は、グリコシルトランスフェラーゼを発現する細胞およびグリコシルトランスフェラーゼ触媒糖類合成に用いられる反応物を合成する細胞の使用に関する。本方法は、容易に入手可能な、比較的安価な出発物質を用いる、単一の容器内での複合体糖類の産物の合成を可能にする。

【0002】

(背景)

モノマーが互いに接続し得る、分岐構造および多様な結合を有するオリゴ糖は、短い配列において情報を送達するのに、任意の他の生物学オリゴマーより大きな可能性を有する。3つのヘキソースから構成されるトリサッカリドに関するアイソマーの順列の数は、38,000より多いと細菌計算されてきた（Laine (1994) *Glycobiology* 4:1-9）。この計算が20の最も一般的に見出される糖を有する3つのヘキソースの置換可能に拡大する場合、可能な順列の数は、直鎖構造および分岐構造が900万を超えるまで上昇する。

【0003】

多数のオリゴ糖アイソマーの有効性は、高度に特異的な様式で相互作用する多くのレセプターオリゴ糖対の進化を可能にする。少なくとも一部はこの多くの異なるアイソマー順列のために、炭水化物は、広範な種々の生物学的相互作用において重要な役割を果たす。例えば、炭水化物は、それぞれのリガンドに対する白血球と他の細胞との結合を生じる認識エレメントとして機能する。炭水化物はまた、感染性の薬剤に対するレセプターとして働き得、そして自己認識に含まれる。炭水化物は、しばしばシグナル機構に含まれる。

【0004】

このような生物学的プロセスにおける炭水化物の役割の増加した理解は、所望

の炭水化物構造を合成する方法に関して大きな要求を生じた。炭水化物の生物学的機能に必須であるが、炭水化物が形成し得る多数の可能な連結は、炭水化物の合成を非常に複雑化する。この理由のために、グリコシルトランスフェラーゼおよび炭水化物の酵素触媒合成におけるその役割は、現在大規模に研究されている。グリコシルトランスフェラーゼは、高い特異性を示し、そして限定された配列および連結の炭水化物構造の形成において有用である。炭水化物の酵素的合成のためのグリコシルトランスフェラーゼの使用は、酵素によって提供される実質的に完全な立体選択性および連結特異性のための化学的方法を超える顕著な利点を提供する（例えば、Itoら、(1993) *Pure Appl. Chem.* 65:753、ならびに米国特許第5,352,670号、および同第5,374,541号を参照のこと）。従って、グリコシルトランスフェラーゼは、治療的目的および他の目的のために用いられる多くの炭水化物の合成における酵素的触媒として、ますます用いられる。

【0005】

しかし、炭水化物化合物の商業的なスケールの生産は、しばしば、炭水化物の酵素的合成および化学的合成に用いられる反応物を得る場合のコストおよび困難性によって複雑にされる。特に、多くのグリコシルトランスフェラーゼに対する基質として用いられるヌクレオチド糖は、高価であるかまたは得るのに困難である。さらに、合成が1より多くのグリコシルトランスフェラーゼを要求するオリゴ糖を作製するために、複数のグリコシルトランスフェラーゼを得、かつ精製する必要性は、オリゴ糖の合成のコストおよび複雑性を、非常に増加し得る。

【0006】

最近、オリゴ糖合成に関する細胞に基づくシステムの使用が、記載された。Endoら((1999) *Carbohydrate Res.* 316:179-183; Koizumiら、(1998) *Nature Biotechnology* 16:847-850もまた参照のこと)は、N-アセチルジクトサミンを産生するために、異なる細胞型の組み合わせのカップリングの使用を記載し、それぞれは、異なるグリコシルトランスフェラーゼヌクレオチド糖を産生する。しかし、これらの方法は、それぞれの反応に対して多様な細胞型を必要とし

、1つは、トランスフェラーゼを産生し、そして他はヌクレオチド糖を産生する。

【0007】

炭水化物化合物の酵素的合成の改良された方法、およびこれらの合成に用いられる前駆体は、多くの有益な化合物の生成を促進する。本発明は、これらおよび他の必要性を満たす。

【0008】

(本発明の要旨)

本発明は、細胞ベースの反応混合物、組換え細胞、および糖類の産物の産生の方法を提供する。反応混合物は、代表的にはアクセプター糖類およびa)ヌクレオチド糖、およびb)ヌクレオチド糖からアクセプター糖類への糖の移行を触媒し、糖類の産物を形成する組換えグリコシルトランスフェラーゼ、をそれぞれ産生する植物細胞または微生物細胞の第一の型が挙げられる。現在好ましい実施形態において、細胞は、野生型細胞によって産生されるより高いレベルでヌクレオチド糖を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ヌクレオチド糖合成に含まれる酵素をコードする1つ以上の外来生遺伝子を含む。

【0009】

本発明はまた、多様な糖類連結が実施される場合の細胞ベースの方法および反応混合物を提供する。これを達成するいくつかの方法が提供される。例えば、本発明は、1より多い組換えグリコシルトランスフェラーゼが発現する細胞を提供する。いくつかの状況においてグリコシルトランスフェラーゼの両方は、同一のヌクレオチド糖を利用する。例えば、本発明は、2つの組換えガラクトシルトランスフェラーゼ（例えば、 α 1, 3-グリコシルトランスフェラーゼおよび β 1, 4-グリコシルトランスフェラーゼ）を発現する細胞を提供し、これらの両方は、UDP-ガラクトースを糖ドナーとして利用する。他の実施形態において、細胞によって産生される組換えグリコシルトランスフェラーゼのそれぞれは、異なるヌクレオチド糖を要求する（例えば、GalNAcトランスフェラーゼおよびガラクトシルトランスフェラーゼを発現する細胞は、UDP-GalNAcおよびUDP-Galの両方を産生する）。

【0010】

複数のグリコシド連結は、反応混合物を用いることによって得られ得る。この反応混合物は、第一の細胞型に加えて、それぞれがa) 少なくとも第二のヌクレオチド糖、およびb) 第二のヌクレオチド糖から第一のグリコシルトランスフェラーゼ反応によって産生される糖類への糖の移行を触媒する、少なくとも第二の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、を産生する少なくとも第二の細胞型を含む。例えば、本発明の反応混合物は、対応するヌクレオチド糖と共に、組換えシアリルトランスフェラーゼおよびCMP-シアル酸を産生する第二の細胞型と共に、組換えガラクトシルトランスフェラーゼおよびGlcNAcトランスフェラーゼを産生する細胞を含み得る。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態において、反応混合物は、全体または一部のヌクレオチド糖再生サイクルを触媒する組換え酵素を産生する1つ以上の細胞型を含む。これらの細胞は、糖ヌクレオチドを再生するために有用であり、これらは、安価な出発物質より比較的高価である。糖ヌクレオチドが消費される場合、ヌクレオシドおよび他の反応成分は、再利用され、さらなる糖ヌクレオチドを産生する。したがって、反応から得られる糖類の産物の量は増加する。

【0012】

本発明のさらなる実施形態は、ヌクレオチド糖合成のための1つ以上の反応物が、合成を触媒する酵素を産生する場合以外の細胞型によって産生される場合の反応混合物を提供する。例えば、本発明の反応混合物は、ヌクレオチド糖シンセターゼを提供する別の細胞型と共に、ヌクレオチドを産生する1つの細胞型を含み得る。また、1つの細胞型は、ヌクレオチド前駆体を提供し得、一方、別の細胞型はヌクレオチドの合成に含まれる酵素を産生する。

【0013】

本発明はまた、細胞型がグリコシルトランスフェラーゼの触媒ドメイン、およびグリコシルトランスフェラーゼに関する糖ドナーとして働くヌクレオチド糖の合成に含まれる酵素の触媒ドメインを含む融合タンパク質を産生する、細胞および反応混合物を提供する。例示的な例は、シアリルトランスフェラーゼの触媒ド

メインがCMP-シアル酸シンセターゼの触媒ドメインと共に見出される、融合タンパク質を産生する細胞である。

【0014】

本発明はまた、ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連化合物を合成するための組換え細胞、反応混合物、ならびに方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連化合物に関する多糖骨格を合成するための方法における使用のための細胞および反応混合物を提供する。これらの方法は、終末グルクロン酸またはGlcNAc残基を含むアクセプター糖類が以下を含む反応混合物と接触する工程を含む：

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

- a) UDP-GlcNAcを形成するための酵素系；および
- b) 終末GlcNAc残基を含むアクセプター糖類を産生するために、アクセプター糖類上でのGlcNAcのUDP-GlcNAcから終末グルクロン酸への移行を触媒する組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；ならびに

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

- a) UDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；および
 - b) 終末グルクロン酸残基を含むアクセプター糖類を産生するために、アクセプター糖類上でのグルクロン酸のUDP-グルクロン酸から終末GlcNAc残基への移行を触媒する組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ；ならびに
- 多糖骨格が合成されるまで反応が進行させる工程。

【0015】

ヘパラン多糖骨格をN-硫酸化、エピマー化、および／またはO-硫酸化に供することによって、反応混合物およびヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連化合物を合成するための反応混合物および方法もまた、提供される。ヘパラン糖類骨格は、塩基処理、続いて化学的硫酸化、またはヘパラン多糖骨格を以下の(a)および(b)を含む微生物細胞または植物細胞を含む反応混合物と接触させる工程を含む酵素的硫酸化法のいずれかによってN-硫酸化され得る：

- a) PAPSを形成するための酵素系；および
- b) N-硫酸化多糖を産生するためにスルフェートのPAPSからヘパラン多

糖への移行を触媒する組換えスルホトランスフェラーゼ。現在好ましい実施形態において、PAPSを形成するための酵素系は、PAPSサイクルを含む。

【0016】

ヘパラン硫酸、ヘパリン、カラゲニン (carragenin) および関連化合物を合成するための方法は、N-硫酸化多糖をグルクロン酸5'-エピメラーゼと接触させ、多糖骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基をイズロン酸に変換する工程をさらに含む得る。得られるイズロン酸含有N-硫酸化多糖は、1つ以上のO-スルホトランスフェラーゼと順々に接触され、ヘパラン硫酸を形成し得る。エピメラーゼとスルホトランスフェラーゼのいずれかまたは両方は、この反応混合物中に存在する組換え細胞によって産生され得る。

【0017】

(詳細な説明)

(定義)

本発明の細胞、反応混合物、および方法は、一般には、モノ糖類またはスルフェート基をドナー基質からアクセプター分子へ移行することによって糖類の産物を産生するために有用である。付加は、一般に、生物分子上のオリゴ糖、多糖（例えば、ヘパリン、カラゲニンなど）または炭水化物部分の非還元末端で起こる。本明細書中で定義されるような生物分子として、炭水化物、タンパク質（例えば、糖タンパク質）、および脂質（例えば、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質およびガングリオシド）のような生物学的に重要な分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】

以下の略語が本明細書中で用いられる：

A r a = アラビノシル；

F r u = フルクトシル；

F u c = フコシル；

G a l = ガラクトシル；

G a l N A c = N-アセチルガラクトサミン；

G l c = グリコシル；

GlcNAc = N-アセチルグルコサミン；

Man = マンノシル；および

NeuAc = シアリル (N-アセチルノイラミニル)。

【0019】

代表的には、シアリ酸は、5-N-アセチルノイラミン酸、(NeuAc) または5-N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) である。しかし、他のシアリ酸は、代わりに用いられ得る。本発明における適切なシアリ酸の異なる形態の総説に関して、Schauer, *Methods in Enzymology*、50:64-89 (1987)、およびSchaur, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*、40:131-234を参照のこと。

【0020】

グリコシルトランスフェラーゼに関するドナー基質は、活性化されたヌクレオチド糖である。このような活性化された糖は一般に、ウリジンおよびグアノシン2リン酸、ならびにシチジン1リン酸、ヌクレオシド2リン酸または1リン酸が脱離基として働く糖の誘導体からなる。細菌系、植物系、および真菌系は、時として、他の活性化されたヌクレオチド糖を用い得る。

【0021】

オリゴ糖は、還元末端の糖類が実際に還元糖であるか否かに関わらず、還元末端および非還元末端を有するように見なされる。受け入れられた命名法にしたがって、オリゴ糖は、左側に非還元末端を、右側に還元末端を伴って本明細書中に例示される。本明細書中に記載される全てのオリゴ糖は、非還元糖類 (例えば、Gal) の関する名称または略称、引き続きグリコシド結合 (α または β)、環結合、結合に関与する還元糖類の環、次いで還元糖類 (例えば、GlcNAc) の名称または略称とともに記載される。2つの糖の間の連結 (例えば、2, 3, 2→3, または (2, 3)) が示され得る。それぞれの糖類は、ピラノースまたはフラノースである。

【0022】

本願において要求される命名法および一般的な研究室手順の多くは、Samb

rookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)、1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、New York、1989に見出され得る。このマニュアルを、本明細書中以下で「Sambrookら」と言及する。

【0023】

用語「核酸」は、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドポリマーまたはリボヌクレオチドポリマーをいい、他に限定されない限り、天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で核酸とハイブリダイズする天然のヌクレオチドの公知のアナログを含む。他に示されない限り、特定の核酸配列は、その相補的配列を含む。

【0024】

用語「作動可能に連結される」は、核酸発現制御配列（例えば、プロモーター、シグナル配列、または転写因子結合部位のアレイ）と第二の核酸配列との間の機能的な連結をいい、ここで、発現制御配列は、第二の配列に対応する核酸の転写および／または翻訳に影響する。

【0025】

細胞に関して用いられる場合、用語「組換え」は、細胞が異種核酸を複製するか、または異種核酸によってコードされるペプチドまたはタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、細胞のネイティブ（非組換え）型に見出されない遺伝子を含み得る。組換え細胞はまた、細胞のネイティブ型に見出される遺伝子を含み得、ここで、遺伝子は改変され、そして人為的手段によって細胞に再導入される。この用語はまた、細胞から拡散を除くことなく改変された細胞に内在性の核酸を含む細胞を含む；このような改変は遺伝子置換、部位特異的変異誘発、および関連技術によって得られるものを含む。

【0026】

「組換え核酸」は、人為的に構築された（例えば、2つの天然に存在する核酸フラグメントまたは合成核酸フラグメントの連結によって形成された）核酸をいう。この用語はまた、人為的に構築された核酸の複製または転写によって産生さ

れる核酸に適用する。「組換えポリペプチド」は、組換え核酸（すなわち、細胞にネイティブでない核酸またはその天然に存在する形態から改変された核酸）の転写、続く得られた転写物の翻訳によって発現される。

【0027】

本明細書中で用いられる「異種ポリヌクレオチド」または「異種核酸」は、外来の供給源から特定の宿主細胞を作り出すものであるか、あるいは同一の供給源由来の場合、その本来の形態から改変されるものである。したがって、原核生物宿主細胞中の異種グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、特定の宿主細胞に内在性であるが改変されたグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む。異種配列の改変が生じ得る。例えば、制限酵素を用いてDNAを処理し、プロモーターに作動可能に連結され得るDNAフラグメントを産生することによって、部位特異的変異誘発のような技術はまた、異種配列を改変するために有用である。

【0028】

「部分配列」は、それぞれ核酸またはアミノ酸（例えば、ポリペプチド）の長い配列の一部を含む核酸またはアミノ酸の配列をいう。

【0029】

「組換え発現カセット」または単に「発現カセット」は、このような配列と適合性の宿主内の構造遺伝子の発現に影響し得る核酸エレメントを用いて、組換えのまたは合成的に産生される核酸構築物である。発現カセットは、少なくともプロモーターおよび任意には、転写終止シグナルを含む。代表的には、組換え発現カセットは、転写される核酸（例えば、所望のポリペプチドをコードする核酸）、およびプロモーターを含む。発現を果たすのに必要または役立つさらなる因子はまた、本明細書中に記載されるように用いられ得る。例えば、発現カセットはまた、宿主細胞からの発現したタンパク質の分泌を指向するシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含む。転写終止シグナル、エンハンサー、および遺伝子発現に影響する他の核酸配列はまた、発現カセットに含まれ得る。

【0030】

本発明の「融合グリコシルトランスフェラーゼポリペプチド」は、グリコシルトランスフェラーゼ触媒ドメインおよびアクセサリ酵素（例えば、CMP-N

e u 5 A c シンセターゼまたはUDP-グルコース4' エピメラーゼ (g a l E)) 由来の第二の触媒ドメインを含むポリペプチドである。融合ポリペプチドは、糖ヌクレオチド (例えば、CMP-NeuAc またはUDP-Gal) の合成および糖ヌクレオチドからアクセプター分子への糖残基の移行を触媒し得る。代表的には、融合ポリペプチドの触媒ドメインは、触媒ドメインが誘導されるグリコシルトランスフェラーゼおよび融合タンパク質の触媒ドメインに、少なくとも実質的に同一である。

【0031】

本明細書中で言及される場合の「アクセサリー酵素」は、反応 (例えば、グリコシルトランスフェラーゼ反応) に関する基質または他の反応物を形成する) を触媒することに関与する酵素である。アクセサリー酵素は、例えば、グリコシルトランスフェラーゼによって糖ドナー部分として用いられるヌクレオチド糖の形成を触媒し得る。アクセサリー酵素はまた、ヌクレオチド糖の形成に要求されるヌクレオチド3リン酸の産生、またはヌクレオチド糖に組み込まれる糖の産生に用いられるものであり得る。

【0032】

「触媒ドメイン」は、通常酵素によって実施される酵素的反応を触媒するのに十分な酵素の部分を用いる。例えば、シアリルトランスフェラーゼの触媒ドメインは、シアリ酸残基を糖ドナーからアクセプター糖類に移行するために十分なシアリルトランスフェラーゼの部分を含む。触媒ドメインは、酵素全体、その部分配列を含み得るか、または天然に見出されるように酵素または部分配列と接触しないさらなるアミノ酸配列を含み得る。

【0033】

用語「単離された」は、酵素の活性を干渉する成分が実質的または本質的にない材料をいう。本発明の細胞、糖類、核酸、およびポリペプチドに関して、用語「単離された」は、そのネイティブな状態において見出されるような材料を正常に伴う成分が実質的または本質的にない材料をいう。代表的には、本発明の単離された糖類、タンパク質または核酸は、銀染色したゲルのバンドの強度または純度を決定するための他の方法によって測定される場合、少なくとも約80%純

純、通常は少なくとも約90%、そして好ましくは、少なくとも約95%純粋である。純度または均質性は、当該分野において周知の多くの方法（例えば、タンパク質サンプルまたは核酸サンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動、引き続き染色による可視化）によって示され得る。特定の目的に関して、高分解能が必要とされ、そしてHPLCまたは類似の精製方法が利用される。

【0034】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列に関して、用語「同一な」またはパーセント「同一性」は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定される場合または視覚的検査によって、最大の対応に関して比較かつ整列される場合、同一である2つ以上の配列または部分配列あるいは同一であるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの特定のパーセントをいう。

【0035】

2つ以上の核酸またはポリペプチドに関して、句「実質的に同一な」は、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定される場合または視覚的検査によって、最大の対応に関して比較かつ整列される場合、少なくとも60%、好ましくは80%、最も好ましくは90~95%ヌクレオチド同一性またはアミノ酸残基同一性を有する2つ以上の配列または部分配列をいう。好ましくは、実質的な同一性は、少なくとも約50残基の長さの配列の領域にわたって存在し、より好ましくは少なくとも約100残基の領域にわたり、そして最も好ましくは、この配列は、少なくとも約150残基にわたって実質的に同一である。最も好ましい実施形態において、配列は、コード領域の全体の長さにわたって実質的に同一である。

【0036】

配列比較に関して、代表的には、1つの配列が参照配列として働き、それと試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列は、コンピューターに入力され、必要ならば、部分配列座標が設計され、そして配列アルゴリズムプログラムパラメーターが設計される。次いで、配列比較アルゴリズムは設計されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列に関するパーセント配列同一性を計算する。

【0037】

比較のための配列の任意の整列は、例えば、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによってか、NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) の相同性整列アルゴリズムによってか、PearsonおよびLipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) の類似性検索方法によってか、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA) によってか、または視覚検査 (Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら、編、Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. との間の連帯のベンチャー (1995 補遺) (Ausubel) を一般的に参照のこと) によって行われ得る。

【0038】

パーセント配列同一性および類似性を決定するのに適切なアルゴリズムの例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、Altschulら (1990)、J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) およびAltschuelら (1977) Nucleic Acid Res. 25:3389-3402にそれぞれ記載される。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を通じて公的に入手可能である。このアルゴリズムは、問い合わせの配列中の長さWの短いワード (word) を同定することによって、まず高スコアリング配列対 (HSP) を同定することを含み、これは、データベース配列中の同一の長さのワードと整列された場合、いくつかの正の閾値スコアT

に一致するかまたは満足するかのいずれかである。Tは、隣接ワードスコア閾値といわれる (Altschulら、前出)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見い出すための検索開始のためのシードとして作用する。次いでワードヒットは、累積整列スコアが増加し得る限り、各々の配列にそって両方向へ伸長される。ヌクレオチド配列に関して、累積スコアは、パラメーターM (一致する残基の対に対する報酬スコア；常に >0) およびN (不一致の残基に対するペナルティスコア；常に <0) を用いて計算される。アミノ酸配列に関して、スコアリングマトリックスが、累積スコアを計算するために用いられる。各々の方向におけるワードヒットの伸長は、以下の場合に停止される：累積整列スコアがその最大に達した値から量Xだけ減少する；1つ以上の負のスコアリング残基整列の蓄積に起因して、累積スコアがゼロまたはそれ以下になる；またはいずれもの配列の末端が到達される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、整列の感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列について) は、11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=4$ 、および両鎖の比較をデフォルトとして用いる。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、3のワード長 (W)、10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスをデフォルトパラメーターとして用いる (HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989) を参照のこと)。

【0039】

パーセント同一性を計算することに加えて、BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列の間の類似性の統計的な分析を実行する (例えば、KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993) を参照のこと)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小合計確率 (smallest sum probability) ($P(N)$) であり、これは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間の一致が偶然生じる確率の指標を提供する。例えば、核酸は、試験核酸の基準核酸に対する比較における最小合計確率が、約0

1未満、より好ましくは約0.01未満、そして最も好ましくは約0.001未満である場合、基準配列に類似であると見なされる。

【0040】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であるというさらなる指標は、第一の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載されるように、第二の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応することである。従って、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは、代表的には第二のポリペプチドに実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一である別の指標は、2つの分子が、以下に記載のようにストリンジントな条件下で互いにハイブリダイズするということである。

【0041】

句「特異的にハイブリダイズする」は、配列が複合体混合物（例えば、細胞全体）DNAまたはRNA中に存在する場合、ストリンジントな条件下で特定のヌクレオチド配列にのみ分子を結合すること、二本鎖化すること、またはハイブリダイズすることをいう。

【0042】

用語「ストリンジントな条件」は、プローブがその標的配列とハイブリダイズするが、他のいずれの配列ともハイブリダイズしないような条件をいう。ストリンジントな条件は、配列依存的であり、そして異なる環境において異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、ストリンジントな条件は、規定されたイオン強度およびpHにおいて、特異的配列の熱融解点（ T_m ）より約5℃低く選択される。 T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度において）である。（一般に、 T_m において標的配列が過度に存在する場合、プローブの50%は平衡状態である）。代表的には

ストリンジントな条件は、pH 7.0～8.3で塩濃度が約1.0M未満の Na^+ イオンであり、代表的には、約0.01～1.0M Na^+ イオン濃度（または他の塩）であり、そして温度は、短いプローブ（例えば、10～50ヌクレオ

チド) については少なくとも約30℃であり、長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドより長い) については少なくとも約60℃である条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアルデヒドのような不安定剤の添加を用いて達成され得る。

【0043】

句「特異的に結合する」または「特異的に免疫反応性の」は、抗体について言及する場合、タンパク質、糖類、および他の生物製剤の異種集団の存在における、タンパク質または他の抗原の存在を決定可能である結合反応をいう。したがって、設計された免疫アッセイ条件下で、特定の抗体は、優先的に特定の抗原と結合し、そしてサンプル中に存在する他の分子と有意な量は結合しない。このような条件下での抗原への特異的な結合は、特定の抗原に対するその特異性に関して選択される抗体を必要とする。種々の免疫アッセイフォーマットは、特定の抗原と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために用いられ得る。例えば、固相ELISA免疫アッセイは、抗原に特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために慣用的に用いられ得る。特異的な免疫反応性を決定するために用いられ得る免疫アッセイのフォーマットおよび条件の記載に関して、HarlowおよびLane (1988)、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publication、New Yorkを参照のこと。

【0044】

特定のポリヌクレオチド配列の「保存的に改変されるバリエーション」は、同一なアミノ酸配列もしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをいうか、または、ポリヌクレオチドがアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のために、多くの機能的に同一な核酸が、任意の所定のポリヌクレオチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGの全てが、アミノ酸アルギニンをコードする。したがって、アルギニンがコドンによって特定化される全ての部位において、コドンは、コードされたポリペプチドを変えずに、記載された任意の対応するコドンに変えられ得る。このような核酸のバリエーションは

、「サイレント置換」または「サイレントバリエーション」であり、これらは、「保存的に改変されるバリエーション」の1つである。ポリペプチドをコードする本明細書中で記載される全てのポリヌクレオチド配列はまた、他で注意されない限り、全ての可能なサイレントバリエーションを記載する。したがって、サイレント置換は、アミノ酸をコードする全ての核酸配列の示された特徴である。当業者は、核酸中の各コドン（本来メチオニンに対してのみのコドンであるAUGを除く）は、標準的技術によって機能的に同一な分子を得るために改変され得る子とを理解する。いくつかの実施形態において、酵素をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは、酵素を産生するために使用される特定の宿主細胞（例えば、酵母、哺乳動物、植物、真菌など）における発現のために最適化される。

【0045】

同様に、非常に類似する特徴を有する異なるアミノ酸と置換されるアミノ酸配列における1または数個のアミノ酸の「保存的アミノ酸置換」はまた、特定のアミノ酸配列に、またはアミノ酸をコードする特定の核酸配列に非常に類似しているとして容易に同定される。任意の特定の配列のこのような保存的に置換されるバリエーションは、本発明の特徴である。コード配列中の単一のアミノ酸または少パーセント（代表的には5%未満、より代表的には1%未満）のアミノ酸を変化、付加または欠失する個々の置換、欠失または付加は、「保存的に改変されるバリエーション」であり、この変化は、アミノ酸の化学的に類似のアミノ酸との置換を生じる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は、当該分野において周知である。例えば、Creighton (1984) Protein, W. H. Freeman and Companyを参照のこと。

【0046】

（好ましい実施形態の説明）

本発明は、糖類の産物を酵素的に合成するための細胞ベースの方法を提供する。糖類の産物を合成するための方法に有用である反応混合物および組換え細胞もまた、提供される。本発明は、組換えグリコシルトランスフェラーゼを産生する細胞を使用し、組換えグリコシルトランスフェラーゼに対する糖ドナーとして働くヌクレオチド糖を含むもまた産生する。現在好ましい実施形態において、本発

明の反応混合物は、ヌクレオチド糖が連続的に再生されるような糖ヌクレオチド再利用に必要とされる酵素を含む細胞を使用する。酵素的糖類合成のために以前入手可能であった方法と異なり、本発明は、単一の組換え生物または細胞において、組換えグリコシルトランスフェラーゼとヌクレオチド糖再生系を結びつける。本発明は、広範な糖類の産物（オリゴ糖、多糖、リボオリゴ糖、リボ多糖、ガングリオシドおよび他の糖脂質、ならびに糖タンパク質を含む）を産生するために有用である。硫酸化多糖（例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、カラゲニンなど）をこうせいするための反応混合物、組換え細胞、および方法もまた提供される。

【0047】

一般には、糖類の産物は、アクセプター糖類を以下を含む少なくとも1つの細胞型と接触させることによって産生される：a) ヌクレオチド糖を産生するための酵素系、およびヌクレオチド糖からアクセプター糖類への糖の移行を触媒し糖類の産物を産生する、組換えグリコシルトランスフェラーゼ。本発明によって、本方法に有用であり得る組換え細胞、および組換え細胞を含みかつ糖類の産物を産生するために有用である反応混合物がまた、提供される。硫酸化糖類および他の硫酸化分子を産生するために、本方法および反応混合物は、組換えスルホトランスフェラーゼを産生しかつスルフトドナー（例えば、PAPS）をまた産生する少なくとも1つの細胞型を含み、好ましくは、再利用システムを使用する。

【0048】

本発明の細胞ベースの反応混合物および方法は、オリゴ糖の酵素的合成のための、以前入手可能であった方法を超える顕著な利点を提供する。第一に、グリコシルトランスフェラーゼに対するドナー基質として働くヌクレオチド糖は、しばしば高価および／または人手困難である。したがって、本発明の1つの利点は、活性化したヌクレオチド糖を供給する必要性が除外されるということである。本発明の生物は、糖ヌクレオチドおよび／または糖が付加するヌクレオチドを連続的に産生し得る。現在好ましい実施形態において、産物形成の間に糖ヌクレオチドからの糖の移行によって生じた、消耗したヌクレオチドの再利用がまた、生じ

得る。なぜなら、生物は、糖ヌクレオチドまたはヌクレオチドのいずれかを再形成する酵素的プロセスを含むからである。組換えグリコシルトランスフェラーゼはまた、細胞によって産生される。したがって、産物の連続的な産生は、安価な原料物質からの開始を生じ得る。グリコシルトランスフェラーゼまたはヌクレオチド糖合成に関与する酵素のいずれも精製する必要性はない；細胞は単に、グリコシルトランスフェラーゼ活性に必要な適切なアクセプター部分および他の反応物を有する反応混合物中におかれる。

【0049】

したがって、特定のグリコシルトランスフェラーゼを産生するのみならず、グリコシルトランスフェラーゼに関する安価な反応物からヌクレオチド糖ドナーを合成され得る細胞の使用を通じて、所望の糖類の産物の、かなり効率的で、迅速、そして比較的安価な合成を達し得る。本発明の方法を用いて産生される糖類は、例えば、診断的使用および治療的使用（例えば、フードスタッフ）を含む多くの使用を見出す。

【0050】

(A. グリコシルトランスフェラーゼおよびヌクレオチド糖合成酵素を発現する組換え細胞)

本発明は、少なくとも1つのグリコシルトランスフェラーゼを発現し、そしてグリコシルトランスフェラーゼに関する糖ドナーとして機能し得るヌクレオチド糖を産生する組換え細胞を提供する。一般に、グリコシルトランスフェラーゼは、異種核酸（すなわち、細胞にネイティブでないかまたは細胞内でのそのネイティブな形態から改変される核酸；このようなグリコシルトランスフェラーゼは、本明細書中で「組換え」「外因性」または「異種」グリコシルトランスフェラーゼとして言及される）によってコードされる。必要に応じて、細胞はまた、ヌクレオチド糖の合成に関与する酵素をコードする1つ以上の外因性遺伝子を含む。代表的には、酵素は、ヌクレオチド糖を産生するための酵素系の一部である。異種核酸は、例えば、細胞に内因性でないか、または細胞に内因性であるポリヌクレオチドの改変型であり得るポリヌクレオチドであり得る。いくつかの適用において、細胞は、1より多い外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子および／

またはヌクレオチド糖合成に関与する酵素をコードする1より多い外因性遺伝子を含む。

【0051】

本発明の組換え細胞は、一般に、特定の酵素をコードするポリヌクレオチドを作製するかまたはそうでなければ得、所望されるようなポリヌクレオチドを改変し、プロモーターおよび他の適切な制御シグナルの制御下の発現カセットにポリヌクレオチドを配置し、そして細胞へ発現カセットを導入することによって作製され得る。1より多い酵素は、同一の宿主細胞内において、同一の発現ベクターまたは細胞内に存在する1より多い発現ベクターのいずれかで発現され得る。

【0052】

(1. グリコシルトランスフェラーゼ)

グリコシルトランスフェラーゼ反応を含む酵素的糖類合成に関して、本発明の組換え細胞は、グリコシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの異種遺伝子を含む。多くのグリコシルトランスフェラーゼは、それらがポリヌクレオチド配列であることが公知である。例えば、「The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases」(http://www.vci.co.uk/TGN/gt_guide.thm)を参照のこと。グリコシルトランスフェラーゼアミノ酸配列およびそこからアミノ酸配列が推定され得るグリコシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列はまた、種々の公的に入手可能なデータベース (GenBank、Swiss-Prot、EMBLなどを含む) 中に見出される。

【0053】

本発明の細胞内で使用され得るグリコシルトランスフェラーゼは、以下を含むが、それらに限定されない：ガラクトシルトランスフェラーゼ、フコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グルクロン酸トランスフェラーゼ、グルクロン酸トランスフェラーゼ、およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼ。適切なグリコシルトランスフ

ユラーゼは、真核生物から、および原核生物から得られるものを含む。

【0054】

例えば、多くの哺乳動物グリコシルトランスフェラーゼがクローン化され、そして発現され、そして組換えタンパク質は、ドナーおよびアクセプター特異性の点で特徴付けられている。グリコシルトランスフェラーゼはまた、ドナーまたはアクセプター特異性に関与する残基を基底する試みにおいて部位特異的変異誘発を通じて研究されており、したがって、本明細書中に議論されるような融合タンパク質を発現する組換え細胞を作製するのに有用である触媒ドメインの同定を容易にする (Aokiら (1990) EMBO. J. 9:3171-3178; Harduin-Lepersら (1995) Glycobiology 5(8):741-758; NatsukaおよびLowe (1994) Current Opinion in Structural Biology 4:683-691; Zuら (1995) Biochem. Biophys. Res. Comm. 206(1):362-369; Setoら (1995) Eur. J. Biochem. 234:323-328; Setoら (1997) J. Biol. Chem. 272:14133-14138)。

【0055】

グリコシルトランスフェラーゼ核酸、およびこのような核酸を得る方法は、当業者に公知である。グリコシルトランスフェラーゼ核酸 (例えば、cDNA、ゲノム、または部分配列 (プローブ)) がクローニングされ得るか、またはインビトロでの方法 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、転写ベースの増幅 (transcription-based amplification system) (TAS)、自己持続配列複製系 (SSR)) により増幅され得る。広範な種々のクローニングおよびインビトロでの増幅の方法論は、当業者に周知である。多くのクローニング練習を通じて当業者を指導するのに十分なこれらの技術および説明書の例は、以下に見出される: BergerおよびKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego

, CA (Berger) ; Sambrookら (1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual (第2版) 1~3 巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrookら) ; Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編、Current Protocols, Greene Publishing Association, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. との間のジョイントベンチャー, (1994補遺) (Ausubel) ; Cashionら、米国特許第5, 017, 478号; および Carr、欧州特許第0, 246, 864号。インビトロでの増幅方法を通じて当業者を指導するのに十分な技術の例は、以下に見出される: Berger, Sambrook、および Ausubel、ならびに Mullisら (1987) 米国特許第4, 683, 202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innisら編) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis) ; Arnheimおよび Levinson (1990年10月1日) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81-94; (Kwohら (1989) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 86:1173; Guatelliら (1990) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomelliら (1989) J. Clin. Chem., 35:1826; Landegrenら (1988) Science 241:1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wuおよび Wallace (1989) Gene 4:560; および Barringerら (1990) Gene 89:117。

【0056】

グリコシルトランスフェラーゼタンパク質、または部分配列をコードするDNA、および以下に記載されるヌクレオチド糖の形成に関与する酵素をコードするDNAは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限、または Narang

ら(1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99のリン酸トリエステル法; Brownら(1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151のリン酸ジエステル法; Beaucageら(1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862のジエチルホスホルアミダイト法; および米国特許第4,458,066号の固体支持体法のような方法による直接的化学合成を含む、上記に記載されるような任意の適切な方法により調製され得る。1つの好ましい実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼをコードする核酸は、慣用的クローニング法により単離され得る。例えば、GenBankまたは他の配列データベースにおいて提供されるようなグリコシルトランスフェラーゼのヌクレオチド配列は、ゲノムDNAサンプルにおけるグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子、または総RNAサンプルにおける(例えば、サザンブロットもしくはノーザンブロットにおける)グリコシルトランスフェラーゼmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブを提供するために用いられ得る。一旦標的グリコシルトランスフェラーゼ核酸が同定されると、それは当業者に公知の標準的な方法(例えば、Sambrookら(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory; BergerおよびKimmel(1987) *Methods in Enzymology*, 152巻: *Guide to Molecular Cloning Techniques*, San Diego: Academic Press, Inc.; または Ausubelら(1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New Yorkを参照のこと)に従って単離され得る。

【0057】

グリコシルトランスフェラーゼ核酸はまた、物理学的特性、化学的特性、または免疫学的特性に基づくアッセイにより発現されるその産物を検出することによりクローニングされ得る。例えば、核酸によりコードされるポリペプチドのドナーからアクセプター部分への単糖の移行を触媒する能力により、クローニングさ

えば、酵母の好ましいコドンは、酵母における発現のためのコード核酸へと置換される)。

【0064】

ほとんどの任意のグリコシルトランスフェラーゼは、本発明の反応混合物および方法において用いられ得る。適切なグリコシルトランスフェラーゼは、所望される特定の糖類の産物に基づいて選択される。グリコシルトランスフェラーゼの以下のリストは、例示を意図するが、限定されない。

【0065】

(a) フコシルトランスフェラーゼ

いくつかの実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼは、フコシルトランスフェラーゼである。多くのフコシルトランスフェラーゼが、当業者に公知である。簡単には、フコシルトランスフェラーゼとしては、GDP-フコースからアクセプター糖のヒドロキシル位へとL-フコースを移行するこれらの酵素のいずれかが挙げられる。いくつかの実施形態では、アクセプター糖は、例えば、オリゴ糖グリコシドにおけるGal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc β 基中のGlcNAcである。この反応に適切なフコシルトランスフェラーゼとしては、Gal β (1 \rightarrow 3, 4) GlcNAc β 1- α (1 \rightarrow 3, 4) フコシルトランスフェラーゼ (FTIII E. C. 番号2. 4. 1. 65) (これは、人乳から最初に特徴付けられた (Palcicら、Carbohydrate Res. 190:1-11 (1989); Prieeelsら、J. Biol. Chem. 256:10456-10463 (1981); およびNunezら、Can. J. Chem. 59:2086-2095 (1981) を参照のこと)、) 、ならびにGal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc β - α (1 \rightarrow 3) フコシルトランスフェラーゼ (FTIV、FTV、FTVI、およびFTVII、E. C. 番号2. 4. 1. 65) (これは、ヒト血清において見出される) が挙げられる。Gal β (1 \rightarrow 3, 4) GlcNAc β 1- α (1 \rightarrow 3, 4) フコシルトランスフェラーゼの組換え形態もまた、特徴付けられている (Dumasら、Bioorg. Med. Letters 1:425-428 (1991) およびKukowska-Latalloら、Genes and Development 4:1288-130

3 (1990) を参照のこと)。他の例示的フコシルトランスフェラーゼとしては、例えば、 α 1, 2フコシルトランスフェラーゼ (E. C. 番号 2. 4. 1. 69) が挙げられる。酵素的フコシル化は、Molliconeら、Eur. J. Biochem. 191:169-176 (1990) または米国特許第5, 374, 655号に記載される方法により実行され得る。フコシルトランスフェラーゼを産生するために用いられる細胞はまた、GDP-フコースを合成するための酵素系を含む。

【0066】

(b) ガラクトシルトランスフェラーゼ

別の群の実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼは、ガラクトシルトランスフェラーゼである。ガラクトシルトランスフェラーゼを用いる場合、外因性ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む細胞はまた、UDP-Galを合成するための酵素系を含む。反応培地は、好ましくは、組換え細胞に加えて、オリゴ糖アクセプター部分および二価金属カチオンを含む。例示的ガラクトシルトランスフェラーゼとしては、 α (1, 3) ガラクトシルトランスフェラーゼ (E. C. 番号 2. 4. 1. 151、例えば、Dabkowskiら、Transplant Proc. 25:2921 (1993) および Yamamotoら、Nature 345:229-233 (1990)、ウシ (GenBank j04989、Joziasseら (1989) J. Biol. Chem. 264:14290-14297)、マウス (GenBank m26925; Larsenら (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:8227-8231)、ブタ (GenBank L36152; Strahanら (1995) Immunogenetics 41:101-105) を参照のこと) が挙げられる。別の適切な α 1, 3 ガラクトシルトランスフェラーゼは、B型血液抗原の合成に関与する α 1, 3 ガラクトシルトランスフェラーゼ (EC 2. 4. 1. 37、Yamamotoら (1990) J. Biol. Chem. 265:1146-1151 (ヒト)) である。

【0067】

また、本発明の方法および組換え細胞における使用に適切なものとしては、 α

(1, 4) ガラクトシルトランスフェラーゼであり、これらとしては、例えば、EC 2. 4. 1. 90 (LacNAcシンセターゼ) およびEC 2. 4. 1. 22 (ラクトースシンセターゼ) (ウシ (D' Agostaroら (1989) Eur. J. Biochem. 183:211-217)、ヒト (Masriら (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 157:657-663)、マウス (Nakazawaら (1988) J. Biochem. 104:165-168)、ならびにE. C. 2. 4. 1. 38およびセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (E. C. 2. 4. 1. 45、Stahlら (1994) J. Neurosci. Res. 38:234-242) が挙げられる。他の適切なガラクトシルトランスフェラーゼとしては、例えば、 α 1, 2ガラクトシルトランスフェラーゼ (例えば、Schizosaccharomyces pombe、Chapellら (1994) Mol. Biol. Cell 5:519-528由来) が挙げられる。

【0068】

(c) シアリルトランスフェラーゼ)

シアリルトランスフェラーゼは、本発明の組換え細胞および反応混合物において有用であるガラクトシルトランスフェラーゼの別の型である。組換えシアリルトランスフェラーゼを産生する細胞はまた、CMP-シアル酸を産生し、これはシアリルトランスフェラーゼについてのシアル酸ドナーである。本発明における使用に適切であるシアリルトランスフェラーゼの例としては、ST3Gal I、II (例えば、ラットまたはヒトのST3Gal III)、ST3Gal IV、ST3Gal I、ST6Gal I、ST3Gal V、ST6Gal II、ST6GalNAc I、ST6GalNAc II、およびST6GalNAc III (本明細書中で用いられるシアリルトランスフェラーゼ命名法は、Tsujiら (1996) Glycobiology 6: v-xiv) に記載されるような方法である) が挙げられる。 α (2, 3) シアリルトランスフェラーゼ (EC 2. 4. 99. 6) といわれる例示的 α (2, 3) シアリルトランスフェラーゼは、シアル酸を、Gal β 1 \rightarrow 3Glc-糖またはグリコシドの非還元末端Galへと移行する。Van den Eijndenら、J. B

iol. Chem., 256:3159 (1981)、Weinsteinら、
J. Biol. Chem., 257:13845 (1982) およびWenら、
J. Biol. Chem., 267:21011 (1992) を参照のこと。別
の例示的 α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ (EC. 2. 4. 99. 4) は
、シアル酸を、二糖またはグリコシドの非還元末端Galへ移行する。Rea-
rickら、J. Biol. Chem., 254:4444 (1979) およびG
illespieら、J. Biol. Chem., 267:21004 (199
2) を参照のこと。さらなる例示的酵素としては、Gal- β -1, 4-Glc
NAc α -2, 6シアリルトランスフェラーゼ (Kurosawaら、Eur
. J. Biochem. 219:375-381 (1994)) が挙げられる。

【0069】

(d) 他のグリコシルトランスフェラーゼ

本発明の組換え宿主細胞により含まれ得る他のグリコシルトランスフェラーゼ
は、シアリルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、およびフ
コシルトランスフェラーゼについて、詳細に記載されている。詳細には、グリコ
シルトランスフェラーゼはまた、例えば、グルコシルトランスフェラーゼ (例え
ば、Alg8 (Stagljovら、Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 91:5977 (1994)) またはAlg5 (Heesenら、Eu
r. J. Biochem. 224:71 (1994))、例えば、 α (1, 3)
N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、 β (1, 4) N-アセチル
ガラクトサミニルトランスフェラーゼ (Nagataら、J. Biol. Che
m. 267:12082-12089 (1992) およびSmithら、J. B
iol. Chem. 269:15162 (1994))、ならびにポリペプチド
N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (Homaら、J. Biol
. Chem. 268:12609 (1993)) のようなN-アセチルガラクト
サミニルトランスフェラーゼであり得る。適切なN-アセチルグルコサミニルト
ランスフェラーゼとしては、GnTI (2. 4. 1. 101、Hallら、BB
RC 176:608 (1991)、GnTII、およびGnTIII (Iha
らら、J. Biochem. 113:692 (1993))、GnTV (Sh

oreibanら、J. Biol. Chem. 268:15391 (1993))、O-連結N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (Bierhuizenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9326 (1992))、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ (Rajputら、Biochem J. 285:985 (1992))、およびヒアルロナンシンターゼが挙げられる。適切なマンノシルトランスフェラーゼとしては、 α (1, 2) マンノシルトランスフェラーゼ、 α (1, 3) マンノシルトランスフェラーゼ、 β (1, 4) マンノシルトランスフェラーゼ、Dol-P-Manシンターゼ、OCh1、およびPmt1が挙げられる。

【0070】

原核生物のグルコシルトランスフェラーゼはまた、本発明の組換え細胞および反応混合物において有用である。このようなグルコシルトランスフェラーゼには、リボオリゴ糖 (LOS) の合成に関与する酵素が挙げられ、この酵素は、多くのグラム陰性細菌によって産生される。このLOSは、代表的に、ヒトの上皮細胞上または宿主分泌物中に見出された複合糖質を模倣する末端グリカン配列を有する (Prestonら (1996) Critical Reviews in Microbiology 23 (3):139-180)。このような酵素には、E. coliおよびSalmonella typhimuriumのような種のrfaオペロンのタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。これらの酵素には、 β 1, 6ガラクトシルトランスフェラーゼおよび β 1, 3ガラクトシルトランスフェラーゼ (例えば、EMBL登録番号M80599およびM86935 (E. coli) ; EMBL登録番号S56361 (S. typhimurium) を参照のこと)、グルコシルトランスフェラーゼ (Swiss-Prot登録番号P25740 (E. coli))、 β 1, 2-グルコシルトランスフェラーゼ (rgaJ) (Swiss-Prot登録番号P27129 (E. coli) およびSwiss-Prot登録番号P19817 (S. typhimurium))、ならびに β 1, 2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (rfaK) (EMBL登録番号U00039 (E. coli) が挙げられる。アミノ酸配列が公知である他のグルコシルトランスフェラーゼは、

rfaB (これは、*Klebsiella pneumoniae*、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Salmonella enterica*、*Yersinia enterocolitica*、*Mycobacterium leprosum*のような生物体において特徴づけされている) のようなオペロン、ならびに *Pseudomonas aeruginosa* の rhl オペロンによってコードされる配列を含む。

【0071】

また、ラクトーN-ネオテトラオース (neotetraose)、D-ガラクトシル- β -1, 4-N-アセチル-D-グルコサミンシル- β -1, 3-D-ガラクトシル- β -1, 4-D-グルコース、およびP^k血液型群トリ糖の配列、D-ガラクトシル- α -1, 4-D-ガラクトシル- β -1, 4-D-グルコースを含む構造物を産生することに関与するグルコシルトランスフェラーゼは、本発明の細胞において使用するために適切であり、これらは、粘膜病原体 *Neisseria gonorrhoeae* および *N. meningitidis* の LOS において同定されている (Scholtenら (1994) J. Med. Microbiol. 41:236-243)。これらの構造物の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼをコードする *N. meningitidis* および *N. gonorrhoeae* は、*N. meningitidis* 免疫型 L3 および L1 より同定されている (Jenningsら (1995) Mol. Microbiol. 18:729-740) および *N. gonorrhoeae* 変異体 F62 (Gotshlich (1994) J. Exp. Med. 180:2181-2190)。 *N. meningitidis* において、3種の遺伝子 (lgtA、lgt および lgtE) からなる遺伝子座は、ラクトーN-ネオテトラオース鎖中の最後の3つの糖に必要とされるグルコシルトランスフェラーゼ酵素をコードする (Wakarchukら (1996) J. Biol. Chem. 271:19166-73)。最近、lgtB および lgtA 遺伝子産物の酵素活性が実証され、これらは、これらの提唱されたグルコシルトランスフェラーゼ機能について第1の直接的な証拠を提供する (Wakarchukら (1996) J. Biol. Chem. 271:19171-276)。 *N. gonorrhoeae*

oeaeにおいて、lgtDおよびlgtCの2種のさらなる遺伝子が存在し、lgtDは、 β -D-GalNacをラクト-N-ネオテトラオース構造体の末端ガラクトースの3位に加え、そしてlgtCは、末端 α -D-Galを短縮型LOSのラクトース要素を加える、これによりP^k血液型群抗原構造物を形成する(Gotshlich(1994)前出)。N. meningitidisにおいて、分離免疫型L1はまた、P^k血液群抗原を発現し、そしてlgtC遺伝子を有することが示されている(Jenningsら(1995)前出)。Neisseriaグルコシルトランスフェラーゼおよびその関連の遺伝子はまた、USPN5,545,553(Gotshlich)に記載されている。Helicobacter pylori由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼおよび遺伝子もまた、特徴づけされている(Martinら(1997)J. Biol. Chem. 272:21349-21356)。

【0072】

(e スルホトランスフェラーゼ)

本発明はまた、組換え細胞、反応混合物、および硫酸化分子を産生するための方法を提供し、この硫酸化分子には、例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、カラゲナン(carragenen)、および関連化合物が挙げられる。これらの実施形態において、本発明の反応混合物は、スルホトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの異種遺伝子を含む組換え細胞を含む。このような細胞はまた、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート(PAPS)のような活性硫酸化剤を産生する。天然でまたはPAPSサイクル再生酵素の添加を介してのいずれかで、1以上のスルホトランスフェラーゼ遺伝子をPAPSをまた産生する細胞に組み込むことにより、オリゴ糖または多糖を硫酸化し得る細胞の遺伝子を提供する(図11)。適切なスルホトランスフェラーゼには、例えば、コンドロイチン-6-スルホトランスフェラーゼ(Fukutaniら(1995)J. Biol. Chem. 270:18575-18580; GenBank登録番号D49915に記載のエウトリcDNA)、グリコサミノグリカンN-アセチルグルコサミンN-デアセチラーゼ/N-スルホトランスフェラーゼ1(Dixonら(1995)Genomics 26:239-241; UL18918)

、およびグリコサミノグリカンN-アセチルグルコサミンN-デアセチラーゼ／N-スルホトランスフェラーゼ2 (Orellanaら (1994) J. Biol. Chem. 269:2270-2276およびErikssonら (1994) J. Biol. Chem. 269:10438-10443に記載のマウスのcDNA; GenBank登録番号U2304に記載のヒトcDNA) が挙げられる。

【0073】

(2. ヌクレオチド糖および他の反応物の合成に関与する付属酵素)

グルコシルトランスフェラーゼ反応は、糖ドナーとして作用するヌクレオチド糖を必要とする。いくつかの実施形態において、本発明の組換え細胞は、天然で、その細胞によって産生されるグルコシルトランスフェラーゼのための糖ドナーとして作用する糖ヌクレオチド、ならびにその糖分子が付着するヌクレオチドを産生し得る (例えば、図1Aを参照のこと)。しかし、いくつかの細胞は、天然で、所望の量の産物である糖類を産生するために、十分な量のヌクレオチドまたはヌクレオチド糖のいずれか、あるいはそれらの両方とも産生しない。このような状況において、本発明の組換え細胞は、グルコシルトランスフェラーゼの異種遺伝子だけでなく、付属酵素をコードする少なくとも1つの異種遺伝子をも含む (例えば、図1Bを参照のこと)。

【0074】

付属酵素は、ヌクレオチド糖の形成に関与する酵素を含む。例えば、付属酵素は、ヌクレオチドに糖を付着するのに関与し得るか、または糖もしくはヌクレオチドを作製するのに関与し得る。生物体が、ヌクレオチドまたは糖ヌクレオチドのいずれかを連続して産生し、そして組換え酵素もまた存在するので、産物の連続的な産生は、低いコストの原料から出発して引き起こされ得る。産物の形成の間、糖ヌクレオチド由来の糖の転位から産生される使用済ヌクレオチドのリサイクルもまた、引き起こされ得る。なぜならば、その生物体は、糖ヌクレオチドまたはヌクレオチドのいずれかを改変するために酵素プロセスを含むからである。ヌクレオチド糖の合成に関与する付属酵素は、当業者に周知である。細菌の多糖の合成および遺伝子の命名法の概説について、例えば、Reevesら、Tre

nds Microbiol. 4:495-503 (1996) を参照のこと。

【0075】

現在の好ましい実施形態において、ヌクレオチド糖を形成するための酵素系は、異種遺伝子によってコードされる酵素を含む。このような細胞は、通常、野生型の細胞によって産生されないか、または野生型の細胞によって有意に高レベルで産生されない、所望のヌクレオチド糖を形成するための手段を提供する。いくつかの例において、異種遺伝子によってコードされる酵素は、細胞によって産生されるヌクレオチドまたはヌクレオチド糖を、所望の結合反応のための基質として作用し得る異なるヌクレオチド糖に転換し得る。他の場合において、異種遺伝子によってコードされる酵素は、内因的にかまたは細胞に加えられた基質の結果としてのいずれかで、細胞に見出される他の基質（例えば、ヌクレオチド）からヌクレオチド糖を合成し得る。複数のヌクレオチド糖の合成および／または転化反応は、ヌクレオチド糖の合成に関与する酵素をコードする1を超える異種遺伝子を含む細胞を使用することによって達成され得る。

【0076】

糖ヌクレオチド再生サイクル全体のための酵素をコードする遺伝子は、目的のグルコシルトランスフェラーゼとともに生物体に導入され得る。従って、得られる組換え細胞は、所望のヌクレオチド糖および所望の産物の両方を産生し得る（図8Aおよび図8B）。ヌクレオチド糖の合成に関与する経路および酵素は、当業者に周知である。細菌の多糖の合成および遺伝子の命名法の概説について、例えば、Reevesら、Trends Microbiol. 4:495-503 (1996) を参照のこと。種々のヌクレオチド糖の産生に使用するサイクル酵素の例は、表1に列举される。

【0077】

表1. サイクル酵素¹

¹以下に列举されるサイクルプロセスの各々は、ヌクレオチド三リン酸の供給源またはヌクレオチドをヌクレオチド三リン酸形態に再生するのに必要とされる酵素のいずれかを必要とする。

【0078】

【化1】

GlcNAc サイクル

UDP-GlcNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc/GalNAc キナーゼ

GlcNAc トランスフェラーゼ

Gal サイクル-1

Gal キナーゼ

UDP-Gal ビロホスホリラーゼ

Gal トランスフェラーゼ

Gal サイクル-2

UDP-Gal 4'-エピマーゼ

UDP-Glc ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ キナーゼ

ホスホグルコムターゼ

ST サイクル

ST 融合 (シリアルトランスフェラーゼ融合 CMP-SA
ジクターゼ)*

*(またはシリアルトランスフェラーゼおよび CMP-SA ジクターゼ)

NeuAc アルドラーゼ

GlcNAc エピマーゼ

Fuc サイクル-1

GDP-Fuc エピマーゼ/リダクターゼ

GDP-Fuc リドラーゼ

GDP-Man ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ

ホスホマンノムターゼ

7コシルトランスフェラーゼ

GalNAc サイクル-1

UDP-GalNAc エピマーゼ

UDP-GlcNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc 1-ホスホキナーゼ*

*(または 1キリキナーゼおよび GlcNAc
ホスホムターゼ)

GlcNAc トランスフェラーゼ

GalNAc サイクル-

UDP-GalNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc トランスフェラーゼ

GlcNAc/GalNAc キナーゼ

Man サイクル

GDP-Man ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ

ホスホマンノムターゼ

Man トランスフェラーゼ

Fuc サイクル-2

GDP-Fuc ビロホスホリラーゼ

7コ-ス:1-ホスホキナーゼ

7コシルトランスフェラーゼ

付属酵素をコードする核酸を、付属酵素のための基質を含む細胞に導入することにより、ヌクレオチド糖の産物に関与する1以上の経路を改変し得る。グルコシルトランスフェラーゼコード核酸を得るための上記の方法もまた、ヌクレオチド糖の形成に関与する酵素をコードする核酸を得るのに適用可能である。例えば、当該分野で公知の核酸（これらのいくつかは、本明細書中に記載される）を直接使用し得るか、または、目的の他の生物体から対応する核酸を単離するためのプローブとして公知の核酸を使用し得る。ヌクレオチド糖合成酵素をコードする

ポリヌクレオチドの単離は、当業者に周知の複数の技術により実施され得る。例えば、本明細書中に記載の特定の遺伝子を選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブは、別の生物体から単離されたDNAの所望の遺伝子を同定するために使用され得る。その他に、当該分野で周知の相同遺伝子を同定するためのそのようなハイブリダイゼーション技術の使用は、上に記載される通りである。

【0079】

(a UDP-Galの再生)

ガラクトシル化産物の糖類を産生するのに有用である組換え細胞の例示的な例には、異種ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられる。しかし、一般にガラクトシルトランスフェラーゼは、ガラクトースドナーとして比較的高価である活性化ヌクレオチド糖UDP-Galを使用する。この反応にかかる費用を減少させるために、細胞に、UDP-Galに導く生合成経路に関与するか、またはヌクレオチド糖ではない分子へのUDP-Galの転換を触媒する酵素をコードする1以上の遺伝子を導入（またはその遺伝子の発現のレベルを上げる）し得る。

【0080】

例えば、グルコキナーゼ(EC 2. 7. 1. 12)は、グルコースのリン酸化を触媒してGlc-6-Pを形成する。グルコキナーゼをコードする遺伝子（例えば、E. coli: GenBank AE000497 U00096、Blattnerら(1997) Science 277: 1453-1474; Bacillus subtilis; GenBank Z99124、AL009126、Kunstら(1997) Nature 390、249-256)は、特徴づけされており、従って、例えば、ハイブリダイゼーションまたは増幅によって多くの生物体から、容易に得られ得る。従って、この遺伝子を含む組換え細胞、および上記の経路における後続の酵素は、生物体によって産生され得るか、または反応混合物に加えられるかのいずれかであり得る、容易に利用可能なグルコースからGDP-グルコースを形成し得る。

【0081】

UDP-Galに導く経路における次の工程は、Glc-6-PをGlc-1-Pに転換するホスホグルコムターゼ (EC 5.4.2.2) によって触媒される。さらに、この遺伝子をコードする遺伝子もまた、幅広い範囲の生物体で特徴づけされている (例えば、*Agrobacterium tumefaciens*: GenBank AF033856、Uttaroら、Gene 150: 117-122 (1994) [Gene (1995) 155: 141-3において公開された訂正が記載される]; *Entamoeba histolytica*: GeneBank Y14444、Ortnerら、Mol. Biochem. Parasitol. 90: 121-129 (1997); *Mesembryanthemum crystallinum*: GenBank U84888; *S. cerevisiae*: GenBank X72016、U09499、X74823、Bolesら、Eur. J. Biochem. 220: 83-94 (1994)、Fuら、J. Bacteriol. 177 (11)、3087-3094 (1995); ヒト: GenBank M83088 (PGM1)、Whitehouseら、Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A. 89: 411-415 (1992)、*Xanthomonas campestris*: GenBank M83231、Koeplinら、J. Bacteriol. 174: 191-199 (1992); *Acetobacter xylinum*: GenBank L24077、Brautasetら、Microbiology 140 (Pt5)、1183-1188 (1994); *Neisseria meningitidis*: GenBank U02490、Zhouら、J. Biol. Chem. 269 (15)、11162-11169 (1994))。

【0082】

UDP-グルコースピロホスホリラーゼ (EC 2.7.7.9) は、この経路において次の工程を触媒し、Glc-1-PをUDP-Glcに転換する。UDP-Glcピロホスホリラーゼをコードする遺伝子は、多くの生物体について記載されている (例えば、*E. coli*: GenBank M98830、Weissbornら、J. Bacteriol. 176: 2611-2618 (1

994) ; *Cricetulus griseus* : GenBank AF004368、Flores-Diazら、J. Biol. Chem. 272:23784-23791 (1997) ; *Acetobacter xylinum* : GenBank M76548、Bredeら、J. Bacteriol. 173、7042-7045 (1991) ; *Pseudomonas aeruginosa* (galU) : GenBank AJ010734、U03751 ; *Streptococcus pneumoniae* : GenBank AJ004869 ; *Bacillus subtilis* : Genbank Z22516、L12272 ; Soldoら、J. Gen. Microbiol. 139 (Pt 12)、3185-3195 (1993) ; *Solanum tuberosum* : GenBank U20345、L77092、L77094、L77095、L77096、L77098、U59182、Katsubeら、J. Biochem. 108:321-326 (1990) ; *Hordeum vulgare* (オオムギ) : GenBank X91347 ; *Shigella flexneri* : GenBank L32811、Sandlinら、Infect. Immun. 63:229-237 (1995) ; ヒト : GenBank U27460、Dugglebyら、Eur. J. Biochem. 235 (1-2)、173-179 (1996) ; ウシ : GenBank L14019、Konishiら、J. Biol. Chem. 114、61-68 (1993))。

【0083】

最後に、UDP-Glc 4'-エピメラーゼ (UDP-Gal 4'-エピメラーゼ ; EC 5. 1. 3. 2) は、UDP-Glc の UDP-Gla への転換を触媒する。Poolmanら (J. Bacteriol. 172:4037-4047 (1990)) によって記載される *Streptococcus thermophilus* UDPガラクトース 4'-エピメラーゼ遺伝子は、本発明において有用である遺伝子の特定の例である。他の生物体の UDP グルコース 4'-エピメラーゼコードポリヌクレオチドがポリヌクレオチドは、*E. coli* または他の所望の宿主細胞で機能する発現制御配列の制御下にある限り、本発明におい

て使用され得、。UDPグルコース4-エピメラーゼをコードする遺伝子を有する例示的な生物体には、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. lividans*, および *stewartii*, ならびに *Salmonella* および *E. Streptococcus* の種が挙げられる。ヌクレオチド配列は、いくつかの生物体由来のUDP-Glc4'-エピメラーゼについて公知であり、これらには、*Pasteurella haemolytica*, GenBank U39043, Potterら, *Infect. Immun.* 64 (3), 855-860 (1996); *Yersinia enterocolitica*, GenBank Z47767, X63827, Shurnikら, *Mol. Microbiol.* 17:575-594 (1995); *Cyamopsis tetragonoloba*: GenBank AJ005082; *Pachysolen tennophilus*: GenBank X68593, Skrzypekら, *Gene* 140 (1), 127-129 (1994); *Azospirillum brasilense*: GenBank Z25478, De Trochら, *Gene* 144 (1), 143-144 (1994); *Arabidopsis thaliana*: GenBank Z54214, Dormanら *Arch. Biochem. Biophys.* 327:27-34 (1996); *Bacillus subtilis*: GenBank X99339, Schrogelら, *FEMS Microbiol. Lett.* 145:341-348 (1996); *Rhizobium meliloti*: GenBank X58126, S81948, Buendiaら, *Mol. Biol.* 5:1519-1530 (1991); *Rhizobium leguminosarum*: GenBank X96507; *Erwinia amylovora*: GenBank X76172, Metzgerら, *J. Bacteriol.* 176:450-459 (1994); *S. cerevisiae*: GenBank X81324 (エピメラーゼおよびUDP-グルコースピロホスホリラーゼのクラスター), Schaaff-Gerstenschlager, *Yeast* 11:79-83 (1995); *Neisseria meningitidis*: GenBank U19895, L20495, Le

eら、*Infect. Immun.* 63:2508-2515 (1995)、Jenningsら、*Mol. Microbiol.* 10:361-369 (1993)；および *Pisum sativum*: GenBank U31544が挙げられる。

【0084】

しばしば、ヌクレオチド糖を合成するのに関与する経路を構成する酵素をコードする遺伝子は、染色体DNAの単一オペロンまたは領域に見出される。例えば、*Xanthomonas campestris* ホスホグルコムターゼ、ホスホマンノムターゼ (*xanA*)、ホスホマンノースイソメラーゼ、およびGDP-マンノースピロホスホリラーゼ (*xanB*) の遺伝子は、単一の連続核酸フラグメントに見出される (Koepflinら、*J. Bacteriol.* 174、191-199 (1992))。 *Klebsiella pneumoniae* ガラクトキナーゼ、ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ、およびUDP-ガラクトース4'-エピメラーゼもまた、単一オペロン中に見出される (Pengら (1992) *J. Biochem.* 112:604-608)。多くの他の例が、本明細書中に引用される参考文献に記載される。

【0085】

UDP-Galを作製する細胞を構成する代替の方法は、図4に示されるUDP-Galサイクルに関与する酵素をコードする遺伝子を細胞に導入することである。この経路は、UDP-Galピロホスホリラーゼ (ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ) から開始し、この酵素は、Gal-1-PをUDP-Galに転換する。UDP-Galピロホスホリラーゼをコードする遺伝子は、いくつかの生物体について特徴付けされており、これらには、例えば、*Rattus norvegicus*: GenBank L05541、Heidenreichら、*DNA Seg.* 3:311-318 (1993)；*Lactobacillus casei*: GenBank AF005933 (ガラクトキナーゼ (*galK*)、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ (*galE*)、ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ (*galT*) のクラスター)、Bettenbrockら、*Appl. Envir*

on. Microbiol. 64:2013-2019 (1998); E. coli: GenBank X06226 (UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼおよびガラクトース-1-Pウリジルトランスフェラーゼに対して galE および galT)、Lemaire ら、Nucleic Acids Res. 14:7705-7711 (1986); B. subtilis: GenBank Z99123 AL009126; Neisseria gonorrhoeae: GenBank Z50023、Ulrich ら、J. Bacteriol. 177:6902-6909 (1995); Haemophilus influenzae: GenBank X65934 (ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ、ガラクトキナーゼ、ムタロターゼおよびガラクトースリプレッサーのクラスター)、Maskell ら、Mol. Microbiol. 6:3051-3063 (1992)、GenBank M12348 および M12999、Tajima ら、Yeast 1:67-77 (1985); S. cerevisiae: GenBank X81324、Schaff-Gerstenschlager ら、Yeast 11:79-83 (1995); Mus musculus: GenBank U41282; ヒト: GenBank M96264、M18731、Leslie ら、Genomics 14:474-480 (1992)、Reichardt ら、Mol. Biol. Med. 5:107-122 (1988); Streptomyces lividans: M18953 (ガラクトース 1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼ、UDP-ガラクトース 4-エピメラーゼ、およびガラクトキナーゼ)、Adams ら、J. Bacteriol. 170:203-212 (1988) が挙げられる。

【0086】

UDP-GlcNAc 4' エピメラーゼ (UDP-GalNAc 4' -エピメラーゼ) (EC 5. 1. 3. 7) (これは、UDP-GlcNAc の UDP-GalNAc への転換および逆反応を触媒する) はまた、本発明の組換え細胞での使用に適切である。この酵素をコードするいくつかの遺伝子座が、上記されている。米国特許第 5, 516, 665 号もまた参照のこと。

【0087】

(b) GDP-フコースの再生)

本発明によって提供される組換え細胞の別の例は、フコシル化産物である糖類を産生するために使用される。フコシルトランスフェラーゼについてのドナーヌクレオチド糖は、GDP-フコースであり、これは、生産するのに比較的高価である。本発明のいくつかの実施形態において、GDP-フコースを得るための費用は、GDP-フコースサイクルを触媒する酵素をコードする1つ以上の外因性の遺伝子を、組換え細胞に導入することによって減少される。

【0088】

フコシル化オリゴ糖を産生する費用を減少させるために、本発明は、比較的安価なGDP-マンノースをGDP-フコースに転換し得る細胞を提供する。これらの細胞は、GDP-マンノースデヒドラターゼ、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース3, 5-エピメラーゼ、またはGDP-4-ケト-6-デオキシ-L-グルコース4-リダクターゼをコードする少なくとも1つの外因性の遺伝子を有する。これらの酵素活性の各々を有する細胞は、GDP-マンノースをGDP-フコースに転換し得る。フコシルトランスフェラーゼのこの細胞への導入により、ドナー活性化糖としてGDP-フコースではなくGDP-マンノースを使用してオリゴ糖アクセプターをフコシル化し得る細胞を得る。

【0089】

GDP-フコース合成酵素をコードする*E. coli* 遺伝子クラスターのヌクレオチド配列は、Stevensonら(1996) *J. Bacteriol.* 178:4885-4893; GenBank登録番号U38473に記載されている。この遺伝子クラスターは、GDP-マンノースデヒドラターゼに対するオープンリーディングフレームを含むと報告されている(ヌクレオチド8633-9754; Stevensonら、前出)。この遺伝子がまた、3, 5エピマー化および4-リダクターゼ活性の両方を有する酵素をコードするオープンリーディングフレームを含むことが、最近になって発見され(PCT特許出願番号US99/00893(1999年7月22日にWO99/36555として公開された)を参照のこと)、従って、GDP-マンノースデヒドラターゼ(GD

P-4-ケト-6-デオキシマンノース) 反応の産物をGDP-フコースに転換し得る。このORF (YEF Bと命名されている) は、ヌクレオチド9757と10722との間に見出される。YEF Bが2つのいずれかの数の活性を有する酵素をコードするというこの発見の前に、1または2つの酵素が、GDP-4-ケト-6-デオキシマンノースのGDP-フコースへの転換に必要とされるかは、公知ではなかった。ヒトF_x酵素をコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、GenBank登録U58766に見出される。

【0090】

組換え細胞はまた、Man-1-PをGDP-Manに転換するピロホスホリラーゼ (EC 2. 7. 7. 22) をコードする遺伝子を含み得る。GDP-ManのGDP-Fucの転換を触媒する上記のもののような酵素とともに存在する場合、このようは細胞は、比較的安価なMan-1-Pから出発してGDP-Fucを合成し得る。適切な遺伝子が、多くの生物体から公知であり、これらには、E. coli: GenBank U13629、AB010294、D43637、D13231, Eastinra, Gene 164:17-23 (1995)、Sugiyamaら、J. Bacteriol. 180:2775-2778 (1998)、Sugiyamaら、Microbiology 140 (Pt 1):59-71 (1994)、Kidoら、J. Bacteriol. 177:2178-2187 (1995); Klebsiella pneumoniae: GenBank AB010296、AB010295、Sugiyamaら、J. Bacteriol. 180:2775-2778 (1998); Salmonella enterica: GenBank X56793、M29713、Stevensonら、J. Bacteriol. 178:4885-4893 (1996) が挙げられる。

【0091】

糖類アクセプターをフコシル化するための本発明の細胞はまた、GDP-フコースの形成のためのマイナーな経路または「捕捉」経路を提供する酵素を利用し得る (参考文献に示される)。この経路において、フコギナーゼによってリン酸化されて、遊離フコースは、フコース1-ホスフェートを形成する。このフコー

ス1-ホスフエートは、グアノシン5'-三リン酸 (GTP) と共に、GDP-
 フコースピロホスホリラーゼにおいて使用されて、GDP-フコースを形成する
 (Ginsburgら、J. Biol. Chem. 236:2389-2393
 (1961) および Reitman、J. Biol. Chem. 255:990
 0-9906 (1980))。GDP-フコースピロホスホリラーゼコード核酸
 は、同時係属中の同一人に譲渡された米国特許出願第08/826,964号 (
 1997年4月9日出願) に記載される。フコキナーゼコード核酸は、例えば
 Haemophilus influenzae (Fleischmann
 ら (1995) Science 269:496-512) および E. coli (
 Lu および Lin (1989) Nucleic Acids Res. 17:4
 883-4884) に記載される。

【0092】

(c. CMP-シアラル酸の再生)

シアリル化反応で有用である本発明の組換え細胞を得るために、CMP-シア
 ル酸シンセターゼ (EC 2. 7. 7. 43、CMP-N-アセチルノイラミン酸
 シンセターゼ) をコードする酵素をコードする遺伝子を導入し得る。このような
 遺伝子は、例えば以下から利用可能である。

【0093】

【数1】

Mus musculus (GenBank AJ006215, Munster §, Proc. Natl.
 Acad. Sci. U.S.A. 95:9140-9145 (1998)), § (Rodríguez-Aparicio § (1992) J. Biol.
 Chem. 267:9257-63), *Haemophilus ducreyi* (Tullius § (1996) J. Biol. Chem. 271:15373-
 80), *Neisseria meningitidis* (Ganguli § (1994) J. Bacteriol. 176:4583-9), §
 連鎖球菌 (Haft § (1994) J. Bacteriol. 176:7372-4), および *E. coli* (GenBank J05023,
 Zapata § (1989) J. Biol. Chem. 264:14769-14774).

(d. 他の酵素)

糖ホスフエートをヌクレオチド糖に転換する他のピロホスホリラーゼが公知で
 ある。例えば、UDP-GalNAcピロホスホリラーゼは、GalNAcのU
 DP-GalNAcへの転換を触媒する。UDP-GlcNAcピロホスホリラ

ーゼ (EC 2. 7. 7. 23) は、GlcNAc-1-PをUDP-GlcNAcに転換する

【0094】

【数2】

(*B. subtilis*: GenBank Z99104 AL009126, Kunst S., *supra*.;
Candida albicans: GenBank AB011003, Mio S., *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14392-14397
 (1998); *Saccharomyces cerevisiae*: GenBank AB011272, Mio S., *前出*. ; *同* :
 GenBank AB011004, Mio S., *前出*).

(e ヌクレオチド糖の消費のための代替経路の破壊)

さらなる実施形態において、本発明の組換え細胞は、野生型細胞と比較して高レベルでヌクレオチド糖を産生し、そして／またはこの細胞によって産生されたヌクレオチド糖は、例えば、多糖の産生を、所望の産物である糖類の産生に転用する。例えば、*Azobacter vinelandii*および*Pseudomonas aeruginosa*は、比較的大量のGDP-Manを産生する。これらの大部分は、多糖アルギネートの合成に使用される。細胞がアルギネートを産生する能力を破壊することにより、増加したレベルのGDP-Manを産生する細胞を獲得し得る。*Pseudomonas*および*Azobacter*でのアルギネートの合成は、GDP-マンノースデヒドロゲナーゼを含み、このデヒドロゲナーゼは、GDP-Manを、アルギネートの直接の前駆体であるGDP-マンヌロン酸に転換する (Tatnellら (1994) *Microbiol.* 140:1745-1754; Tatnellら (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139 (Pt. 1):119-127; Lloretら (1996) *Mol. Microbiol.* 21:449-457)。例えば、GDP-Manデヒドロゲナーゼの活性を破壊する変異を導入することにより、野生型細胞よりも高レベルのGDP-Manを産生する細胞を獲得し得る。基質としてGDP-Manを使用するグルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が、細胞に導入される場合、アルギネートの合成にもはや使用されないGDP-Manは、所望のマンノシル化オリゴ糖の合成に転用される。あるいは、GD

P-Manを異なる活性化糖（例えば、GDP-Fuc）に転換する上記のような1以上の酵素をコードする遺伝子を導入し得る。次いで、得られた組換え細胞は、目的のフコシル化オリゴ糖を産生するために使用され得る。

【0095】

同様に、UDP-GlcNAcの利用により、ペプチドグリカンの合成を、所望のGluNAc含有オリゴ糖に転用する組換え細胞を構成し得る。例えば、E. coliにおいて、順次作用する一連の6種の酵素は、UDP-GluNAcのペプチドグリカンの前駆体への転換に関与する（Mengin-Leereulxら（1983）J. Bact. 154:1284-1290）。これらの酵素の1つ（好ましくは、第1作用酵素）を破壊することによって、そしてGluNAcトランスフェラーゼを細胞に導入することによって、細胞によって産生される大量のUDP-GlcNAcを、所望のGluNAc含有オリゴ糖の産物に転用し得る。あるいは、UDP-GlcNAc 4'-エピメラーゼをコードする遺伝子の導入により、UDP-GlcNAcをUDP-GalNAcへ転換することになり得、次いで、このUDP-GalNAcは、細胞にまた導入された外因性遺伝子によってコードされるUDP-GalNAcトランスフェラーゼのための糖ドナーとして役に立ち得る。

【0096】

別の例として、E. coliを含むEscherichia sp. は、膜結合ポリシアル酸を産生し得る。ポリシアル酸の合成が破壊される変異株は、CMP-シアル酸を蓄積する（VimrおよびTroy（1985）J. Bact. 164:854-860; Gonzalez-Clementeら（1990）Biochem. 371:1101-1106; Choら（1994）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91:11427-11431）。シアリルトランスフェラーゼ遺伝子をこれらの変異株に導入することで、大量のシアリル化産物である糖類を産生し得る組換え細胞を得る。この外因性多糖コラン酸（colanic acid）はまた、前駆体としてGDP-フコースを使用して、E. coliによって産生される。従って、GDP-フコースのコラン酸への転換に関与する酵素の活性を破壊し得る（例えば、GDP-Man 4,

6-デヒドラターゼ; Stevensonら (1996) J. Bacteriol. 178:4885-4893)。

【0097】

Azorhizobium, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, および *Sinorhizobium* 属に属する細菌は、リボキトオリゴ糖 (LCO) を産生し得る。これらの属の少なくともいくつかにおいて、フコースを LCO 前駆体に転換するためのドナーとして GDP-フコースを使用する フコシルトランスフェラーゼが、コードされる (Mergaertら (1997) FEBS Lett. 409:312-316)。従って、このフコシルトランスフェラーゼの活性を破壊することによって、この細胞によって産生される GDP-フコースを他の用途に転用し得る。例えば、異なるフコシルトランスフェラーゼ遺伝子がこの細胞に導入され得、このようにして、所望のフコシル化糖類を産生する組換え細胞を得る。

【0098】

ポリマー合成の、破壊による所望の糖類の産生に転用し得る生物体および関連するヌクレオチド糖の他の例には、以下が挙げられる：

【0099】

【数3】

Azotobacter vinelandii/GDP-Man; *Pseudomonas sp.*/UDP-Glc and GDP-Man; *Rhizobium sp.*/UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man; *Erwinia sp.*/UDP-Gal, UDP-Glc; *Escherichia sp.*/UDP-GlcNAc, UDP-Gal, CMP-NeuAc, GDP-Fuc; *Klebsiella sp.*/UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-GlcNAc (たとえば Hamadeh & (1996) *Infect. Immun.* 64: 528-534); *Hansenula jadinii*/ GDP-Man, GDP-Fuc; *Candida famata*/UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc (Ko & (1996) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60: 41-48); *Acetobacter xylinum*/GDP-Man (Petroni & (1996) *J. Bacteriol.* 178: 4814-4121) および *Saccharomyces cerevisiae*/UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man, GDP-GlcNAc.

変異体を標的遺伝子に導入する方法は、当業者に周知であり、そして例えば、Ausubel、Sambrook、および Berger (全て前出) に記載される。

【0100】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え細胞は、複数のヌクレオチド糖またはヌクレオチドを産生し得、これにより、標的の糖を産生するために、それぞれ、複数のグリコシルトランスフェラーゼまたは支持するサイクル酵素とともに複数のグルコシルトランスフェラーゼの導入を可能にする。これは、単一の生物体を使用する産物において、複数のグルコシド結合の産生を可能にする。例えば、生物体がUDP-GalおよびUDP-GlcNAcの両方を産生する場合、GalトランスフェラーゼおよびGlcNAcトランスフェラーゼの添加により、同じ生物体から2つの新しいグリコシド結合産生を可能にする(図2)。別の例として、生物体が、高いレベルのUTPを産生する場合、UDP-GalおよびUDP-GlcNAcの産生のための酵素をコードする遺伝子、ならびにGalトランスフェラーゼおよびGlcNAcトランスフェラーゼをコードする遺伝子を添加することによって、2つの新しいグリコシド結合が、単一の生物体から形成され得る。これらの例において、このトランスフェラーゼがグリコシドの重合を可能にする場合、長鎖のオリゴ糖および多糖が形成され得る。

【0101】

(3. 融合タンパク質)

いくつかの実施形態において、本発明の組換え細胞は、所望のオリゴ糖の合成に関与する1を超える酵素活性を有する融合タンパク質を発現する。この融合ポリペプチドは、例えば、付属酵素の触媒ドメインに結合するグリコシルトランスフェラーゼの触媒ドメインから構成され得る。付属酵素の触媒ドメインは、例えば、グリコシルトランスフェラーゼのためのドナーであるヌクレオチド糖の形成における工程を触媒するか、またはグリコシルトランスフェラーゼに関与する反応を触媒し得る。例えば、グリコシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドは、ヌクレオチド糖合成に関与する酵素をコードするポリヌクレオチドをインフレームで結合され得る。次いで、得られる融合タンパク質は、ヌクレオチド糖の合成ばかりでなく、糖部位のアクセプター分子への転移を触媒し得る。この融合タンパク質は、1つの発現可能なヌクレオチド配列に連結される2つ以上のサイクル酵素であり得る。本発明のポリペプチドは、当業者に周知の種々の

組換えDNA技術を利用して、容易に設計および製造され得る。適切な融合タンパク質は、1999年6月24日にWO99/31224として刊行されたPCT特許出願PCT/CA98/01180に記載される。

【0102】

(4. 組換え細胞の構築)

本発明の組換え細胞は、所望のグリコシル化反応を触媒するグルコシルトランスフェラーゼをコードする外因性遺伝子、グルコシルトランスフェラーゼのためのドナー基質であるヌクレオチド糖を産生するための酵素系、および外因性糖類アクセプター部分を含む。グルコシルトランスフェラーゼは、ヌクレオチド糖からアクセプター部分へ糖の転移を触媒して所望のオリゴ糖を産生する。

【0103】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド糖の産生のための酵素系はまた、組換え方法によって改変される。例えば、この酵素系は、細胞に対して外因性である遺伝子によってコードされるか、または上記のようにヌクレオチド糖の産生を増加するために改変される1以上の酵素を含み得る。

【0104】

代表的に、外因性グリコシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドまたはヌクレオチド糖の合成に関与する酵素は、所望の宿主細胞で機能性であるプロモーターの制御下に置かれる。非常に幅広い種々のプロモーターが周知であり、そして特定の適用に依存して本発明のベクターに使用され得る。通常、選択されるプロモーターは、このプロモーターが活性化されるべき細胞に依存する。リボソーム結合部位のような他の発現制御配列、転写終結部位などもまた、必要に応じて含まれる。特定の宿主細胞の使用に適切である発現制御配列は、しばしば、細胞中で発現される遺伝子をクローニングすることによって得られる。本発明の組換え細胞は、植物細胞または例えば、酵母細胞、細菌細胞、もしくは真菌細胞のような微生物であり得る。多くの他の細胞の中で、例えば、適切な細胞の例には、*Azotobacter* sp. (例えば、*A. vinelandii*)、*Pseudomonas* sp.、*Rhizobium* sp.、*Erwinia* sp.、*Escherichia* sp. (例えば、*E. coli*)

、および *Klebsiella* sp. が挙げられる。この細胞は、任意のいくつかの属であり得、これらには、サッカロミセス属（例えば、*S. cerevisiae*）、カンジダ属（例えば、*C. utilis*、*C. parapsilosis*、*C. krusei*、*C. versatilis*、*C. lipolytica*、*C. zeylanoides*、*C. guilliermondii*、*C. albicans*、および *C. humicola*）、ピキア（*Pichia*）属（例えば、*P. farinosa* および *P. ohmeri*）、トルロプシス属（例えば、*T. candida*、*T. sphaerica*、*T. xylinus*、*T. famata*、および *T. cersatilis*）、デバリオミセス（*Debaryomyces*）属（例えば、*D. subglobosus*、*D. cantarellii*、*D. globosus*、*D. hansenii*、および *D. japonicus*）、ジゴサッカロミセス（*Zygosaccharomyces*）属（例えば、*Z. rouxii* および *Z. bailii*）、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）属（例えば、*K. marxianus*）、ハンセヌラ（*Hansenula*）属（例えば、*H. anomala* および *H. jadinii*）、ブレタノミセス（*Brettanomyces*）属（例えば、*B. lambicus* および *B. anomalus*）、およびクバコが挙げられる。

【0105】

プロモーターおよび他の制御シグナルは、調査中である遺伝子由来であり得るか、または異なる遺伝子もしくは異なる種から得られる異種プロモーターもしくは他のシグナルであり得る。遺伝子の連続発現が所望される場合、ほとんどの環境条件、および発生または細胞の分化の状態下で一般に、活性である「構成的」プロモーターを使用し得る。植物での使用のための適切な構成的プロモーターには、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）35S 転写開始領域およびVIプロモーター領域、*Agrobacterium tumefaciens* のT-DNA由来の1'-または2'-プロモーター、ならびに当業者に公知の植物細胞において活性である他のプロモーターが挙げられる。他の適切なプロモーターには、Figwortモザイクウイルス、アクチンプロモーター、ヒ

ストンプロモーター、チュープリンプロモーター、またはマンノピン (mannopine) シンターゼプロモーター (MAS) 由来の完全長の転写プロモーターが挙げられる。他の構成的植物プロモーターには、特に、*Arabidopsis* (SunおよびCallis、*Plant J.*、11(5):1017-1027 (1997)) 由来の種々のユビキチンまたはポリユビキチンのプロモーター、mas、MacまたはDoubleMacのプロモーター (米国特許第5,106,739号、およびComairら、*Plant Mol. Biol.* 15:373-381 (1990) に記載される) ならびに当業者に公知の種々の植物遺伝子由来の他の転写開始領域が挙げられる。このような遺伝子には、例えば、*Arabidopsis* 由来のACT11 (Huangら、*Plant Mol. Biol.* 33:125-139 (1996))、*Arabidopsis* 由来のCat3 (GenBank第U43147、Zhongら、*Mol. Gen. Genet.* 251:196-203 (1996))、*Brassica napus* 由来の遺伝子コードステアロイルアシルキアタンパク質デサチュラーゼ (Genbank第X74782、Solocombeら、*Plant Physiol.* 104:1167-1176 (1994))、トウモロコシ由来のGPc1 (GenBank第X15596、Martinezら、*J. Mol. Biol.* 208:551-565 (1989))、トウモロコシ由来のGPc2 (GenBank第U45855、Manjunathら、*Plant Mol. Biol.* 33:97-112 (1997)) が挙げられる。植物に対して有用なプロモーターは、プロモーターが植物において機能的であることが見出されている、植物細胞、植物ウイルス、または他の宿主由来のTiプラスミドまたはRiプラスミドから得られる。植物において機能的であり、従って本発明の方法での使用に適切である細菌のプロモーターは、オクトピンシンセターゼプロモーター、ノバリンシンセターゼプロモーター、およびマンノピンシンセターゼプロモーターが挙げられる。適切な内因性植物のプロモーターには、リブ羅斯-1、6-ビホスフエート (RUBP) カルボキシラーゼ小サブユニット (ssu) プロモーター、 α -コングルチニンプロモーター、ファゼオリンプロモーター、ADHプロモーター、および熱ショックプロモーターが挙げら

れる。

【0106】

*E. coli*での使用のためのプロモーターには、*T7*、*trp*、または λ のプロモーターが挙げられる。リボソーム結合部位および、好ましくは、転写末端シグナルもまた、提供される。真核細胞について、制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、シトメガロウイルスなど由来のエンハンサー、およびポリアダニル化配列を必要に応じて含むプロモーターを代表的に含み、そしてスプライシングのドナー配列およびアクセプター配列を含んでもよい。

【0107】

酵母において、便利なプロモーターには、GAL1-10 (JohnsonおよびDavies (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:1440-1448) ADH2 (Russellら (1983) *J. Biol. Chem.* 258:2674-2682) PHO5 (EMBO J. (1982) 6:675-680)、およびMF α (HersekowitzおよびOshima (1982) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Strathern、Jones、およびBroach編) Cold Spring Harbor Lab.、Cold Spring Harbor、N. Y.、181-209頁) が挙げられる。酵母で使用のための別の適切なプロモーターは、Cousensら、Gene 61:265-275 (1987) に記載されるようなADH2/GAPDHハイブリッドプロモーターである。例えば、真菌アスペルギルス属の株のような糸状真菌 (McKnightら、米国特許第4,935,349号) に対して、有用なプロモーターの例には、ADH3プロモーター (McKnightら、EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) および*tpiA*プロモーターのような*Aspergillus nidulans* 解糖遺伝子由来のプロモーターが挙げられる。適切なターミネーターの例は、ADH3ターミネーター (McKnightら) である。

【0108】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、誘導性プロモーターの制

御下に置かれ、このプロモーターは、発現レベルが、例えば、温度、pH、嫌気状態または好気状態、光、転写因子、および化学物質などの環境因子または発生源因子によって変更される、遺伝子の発現を方向付けるプロモーターである。このようなプロモーターは、本明細書中で「誘導性」プロモーターといい、このプロモーターにより、グルコシルトランスフェラーゼまたはヌクレオチド糖の合成に関与する酵素の発現のタイミングを制御し得る。E. coli および他の細菌宿主細胞に対する誘導性プロモーターは、当業者に公知である。これらには、例えば、lac プロモーターが挙げられる。原核生物の発現のための特に好ましい誘導性プロモーターは、ガラクトース代謝産物に関与する酵素をコードする遺伝子から得られる、プロモーター成分に結合する tac プロモーター成分を含む二重プロモーターである（例えば、UDPガラクトース4-エピメラーゼ遺伝子（galE）由来のプロモーター）。1997年11月7日に出願された米国特許出願第08/965,850号に記載されるこの二重 tac-gal プロモーターは、いずれか一方のプロモーターのみによって提供されるプロモーターよりも高いレベルの発現を提供する。

【0109】

植物で使用のための誘発性プロモーターは、当業者に公知であり（例えば、Kuhlemeierら（1987）Ann. Rev. Plant Physiol. 38:221に引用される参考文献を参照のこと）、そして Arabidopsis thaliana の 1, 5-リブローズビスホスフェートカルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子のプロモーター（「ssu」プロモーター）を含む。このプロモーターは、光合成組織、薬特異的プロモーター（EP344029）、および例えば、Arabidopsis thaliana（Krebersら（1988）Plant Physiol. 87:859）の種子特異性プロモーターでのみ光誘発性であり、そして活性である。

【0110】

他の生物体に対する誘発性プロモーターはまた、当業者に周知である。これらには、例えば、アラビノースプロモーター、lacZ プロモーター、メタロチオネインプロモーター、および熱ショックプロモーター、ならびに他の多くのプロ

モーターが挙げられる。

【0111】

適切な宿主細胞に置かれる場合、ポリヌクレオチドの発現を駆動する遺伝子制御シグナルに作動可能に連結される目的のポリヌクレオチドを含む構造体を、「発現カセット」と呼ぶ。グルコシルトランスフェラーゼおよび／またはヌクレオチド糖の合成に関与する酵素をコードする発現カセットは、しばしば、宿主細胞への導入のための発現ベクターに置かれる。発現ベクターに加えて、このベクターは、代表的に、このベクターが1以上の選択された宿主細胞において独立して複製することを可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列は、このベクターが宿主の染色体のDNAから独立して複製することを可能にする配列であり、複製起点または自律的な複製配列を含む。このような配列は、種々の細菌について周知である。例えば、プラスミドpBR322の複製起点は、ほとんどのGram-陰性細菌に対して適切である。あるいは、このベクターは、宿主細胞のゲノム相補体に組み込まれ、そして細胞がDNAの複製を受けるときに複製されることによって、複製され得る。細菌の細胞に存在する酵素の発現に対して好ましい発現ベクターは、pTGKであり、このpTGKは、二重tac-galプロモーターを含み、1997年11月7日に出願された米国特許出願第08/965,850号に記載される。

【0112】

ポリヌクレオチド構成物の構成は、一般に、細菌中で複製可能なベクターの使用を必要とする。多数のキットが、細菌のプラスミドの精製のために市販される。その適切な使用のために、製造業者の指示に従う（例えば、EasyPrep J、FlexiPrep J（この両方は、Pharmacia Biotech による）；StratageneのStrataClean J；およびQIAexpress Expression System、Qiagen）。次いで、この単離されそして精製されたプラスミドは、さらに、他のプラスミドを産生するために製造され、そして細胞をトランスフェクトするために使用される。StreptomycesまたはBacillusのクローニングがまた、可能である。

【0113】

選択可能なマーカーが、しばしば、本発明の細胞を構成するために使用される発現ベクターに取り込まれる。これらの遺伝子は、選択的な培養培地において増殖するトランスフェクトされた宿主細胞の生存または増殖のために必要とされるタンパク質のような遺伝子産物をコードし得る。選択遺伝子を含むベクターでトランスフェクトされない宿主細胞は、この培養培地で生存しない。代表的な選択遺伝子は、アンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール、またはテトラサイクリンのような抗生物質、または他の毒素に対して耐性を与えるタンパク質をコードする。あるいは、選択マーカーは、栄養要求性欠乏を補完するか、または複合培地から利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードし得る（例えば、*Bacilli* についてD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。しばしば、このベクターは、ベクターが標的細胞に導入される前に複製される、例えば、*E. coli* または他の細胞で機能する1つの選択マーカーを有する。多数の選択マーカーは、当業者に公知であり、例えば、前出のSambrookらに記載される。細菌細胞での使用のための好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性マーカーである（VieiraおよびMessing、Gene 19:259（1982））。例えば、カナマイシン選択を使用することは、アンピシリン選択より有利であり（なぜならば、アンピシリンは、培養媒体中でβ-ラクタマーゼによって迅速に分解されるから）、これによって、選択圧力を解除し、ベクターを含まない細胞を用いて、この培養物を過剰に増殖させることを可能にする。

【0114】

哺乳動物の細胞での使用に適切な選択マーカーには、例えば、ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子（DHFR）、チミジンキナーゼ遺伝子（TK）、または薬物耐性を与える原核生物の遺伝子、ミコフュノール酸を用いて選択され得るgpt（キサンテンーホスホリボシルトランスフェラーゼ）；G418、ハイグロマイシン、またはピューロマイシンを用いて選択され得るneo（ネオマイシンホスボトランスフェラーゼ）；メトトレキサートを用いて選択され得るDHFR（ジヒドロ葉酸リダクターゼ）が挙げられる（Mulligan & Berg（1

981) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 78:2072; Southern & Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet 1:327)。

【0115】

植物および／または他の真核生物細胞のための選択マーカーは、しばしば、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、またはクロラムフェニコールのような殺生剤または抗生物質に対する耐性、あるいはクロルスルフロン (chlor-sulfuron) またはBastaのような除草剤耐性を与える。選択マーカーに対する適切なコード配列の例は、抗生物質カナマイシンに耐性を与える酵素ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードするneo遺伝子 (Beckら (1982) Gene 19:327) ; 酵素ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼをコードし、そして抗生物質ハイグロマイシンに耐性を与えるhyg遺伝子 (GritzおよびDavies (1983) Gene 25:179) ; ならびに除草剤化合物であるホスフィノスリシンおよびピアラフオスに耐性を与えるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼをコードするbar遺伝子 (EP242236)。

【0116】

1以上の上に列挙した成分を含む適切なベクターの構成は、上に引用した参考文献に記載されるような標準的な連結技術を利用する。単離したプラスミドまたはDNAフラグメントは、必要とされるプラスミドを産生するために所望される形態で、切断、改変、および再連結される。構成されるプラスミド中で正しい配列を確認するために、そのプラスミドは、制限エンドヌクレアーゼの消化、および／または公知の方法に従う配列決定によるような、標準的な技術によって分析され得る。これらの目的を達成するための分子クローニング技術が、当該分野で公知である。組換え核酸の構成に適切である広範な種々のクローニング方法およびインビトロ増幅方法は、当業者に周知である。これらの技術および多くのクローニングの実施を介して当業者のための有益な説明の例は、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 152

卷、Academic Press, Inc. San Diego, Ca (Berger) ; および Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel 編、Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. (1998 Supplement) との合弁 (Ausubel) に見出される。

【0117】

本発明の組換え細胞を構成するために適切な種々の共通のベクターは、当該分野で周知である。細菌においてクローニングするための共通のベクターには、pBLUESCRIPT™ のような pBR322 誘導ベクター、および λ-ファージ誘導ベクターが挙げられる。酵母におけるベクターには、Yeast Integrating プラスミド (例えば、YIp5) および Yeast Replicating プラスミド (YRp 系プラスミド) ならびに pGPD-2 が挙げられる。哺乳動物の細胞での発現は、種々の一般に入手可能なプラスミドを使用して達成され得、これらのプラスミドには、pSV2、pBC12BI、および p91023、ならびに溶解性ウイルスベクター (例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびパキエロウイルス)、エピソードウイルスベクター (例えば、ウシの乳房腫ウイルス)、およびレトロウイルスベクター (例えば、マウスのレトロウイルス) が挙げられる。

【0118】

発現ベクターを選択される宿主細胞に導入するための方法は、特に重要ではなく、このような方法は、当業者に公知である。例えば、発現ベクターは、原核生物の細胞 (E. coli を含む) に、塩化カルシウムによる形質転換によって導入され得、そして真核細胞に、リン酸カルシウムによる処理またはエレクトロポレーションによって導入され得る。

【0119】

(B. 反応混合物および産物である糖類を合成するための方法)

本発明はまた、反応混合物および本発明の組換え細胞を使用して産物である糖類 (この産物は、2 つ以上の糖類残基から構成される) を調製するための方法を

提供する。反応混合物中で使用される組換え細胞は、少なくとも1つのグリコシルトランスフェラーゼ、およびグリコシルトランスフェラーゼに対して糖ドナーとして機能するヌクレオチド糖を発現する。これらの反応混合物はまた、グルコシルトランスフェラーゼにより、所望のオリゴ糖を形成するために糖が移され得るアクセプター糖類を含む。

【0120】

本発明の組換え細胞は、培養物中で増殖され、所望のスケールの反応における使用のために十分な多数の細胞を得る。それぞれの宿主細胞の増殖のための方法、および培養培地は、当業者に周知である。培養物、例えば、通気スピナーまたは振盪培養において、あるいはさらに好ましくは、発酵槽において実施され得る。いくつかの実施形態において、このグルコシルトランスフェラーゼの遺伝子は、誘導性プロモーターの制御下にある。次いで、グルコシルトランスフェラーゼの発現は、一般に、細胞増殖期の間、ならびに細胞の収集の前、さらに細胞の処理の前に誘発される。

【0121】

所望の細胞密度まで組換え細胞を増殖させる場合、代表的に、この細胞は、本発明の反応混合物および方法を使用して処理される。例えば、この細胞は、一般に、浸透化処理されるか、そうでなければこの細胞への糖類アクセプターの侵入を可能にするように破壊される。このグルコシルトランスフェラーゼおよびこの細胞によって産生されるヌクレオチド糖は、いくつかの状況において、この細胞から細胞外液に拡散する。有意に酵素活性およびヌクレオチド糖の安定性を低下させないように細胞を浸透化処理する方法は、当業者に公知である。細胞は、濃縮、乾燥、凍結乾燥、界面活性剤での処理、超音波処理、機械的破壊、酵素処理などに供され得る。

【0122】

次いで、処理した細胞を、グリコシルトランスフェラーゼの酵素活性に必要なか、または所望される、当業者に公知のさらなる反応物を含む反応混合物中で使用される。反応混合物中で使用される処理した細胞の濃度は、代表的に、約0.1%（湿潤重量／体積）と50%（湿潤重量／体積）の間であり、より好ましくは

、約1%（湿潤重量／体積）と約20%（湿潤重量／体積）の間であり、そして最も好ましくは、約2%（湿潤重量／体積）と約10%（湿潤重量／体積）の間であるか、または対応する量の乾燥細胞である。

【0123】

この反応混合物はまた、糖類アクセプターを含む。シアリルトランスフェラーゼに対して適切なアクセプターは、一般に、Gal残基を含み、そして例えば、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc、ラクト-N-テトラオース、Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc、Gal β 1 \rightarrow 3Ara、Gal β 1 \rightarrow 6GlcNAc、Gal β 1 \rightarrow 4Glc（ラクトース）、Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1-OCH₂CH₃、Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1-OCH₂CH₂CH₃、Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1-OCH₂CH₃、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc、Gal β 1-OCH₃、メリビオース、ラフィノース、スタキオース、およびラクト-N-ネオテトラオース（LNnT）が挙げられる。いくつかの実施形態において、本発明の組換え細胞および反応混合物で使用されるシアリルトランスフェラーゼは、シアル酸を、Gal β 1, 4GlcNAc配列に、完全なシアリル化カルボキシレート構造の末端シアル酸に内在する最も共通した最後から2番目の配列に移す。唯一3つのクローニングされた哺乳動物のシアリルトランスフェラーゼは、このアクセプターの要求を満たし、これらの各々は、シアル酸を、糖タンパク質のN結合型カルボキシレート基に移すことが実証されている。アクセプターとしてGal β 1, 4GlcNAcを使用するシアリルトランスフェラーゼの例を、表1に示す。

【0124】

（表1：アクセプター基質としてGal β 1, 4GlcNAc糖類を使用するシアリルトランスフェラーゼ）

【0125】

【表1】

シアリルトランスフェラーゼ	供給源	形成された構造	参照
ST6Gal I	哺乳動物	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	哺乳動物	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	哺乳動物	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	発光菌属	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

- 1) Goochee S. (1991) *Bio/Technology* 9: 1347-1355
- 2) Yamamoto S. (1996) *J. Biochem.* 120: 104-110
- 3) Gilbert S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276

シアリルトランスフェラーゼの命名法について、Tsujiiら (1996) *Glycobiology* 6: v-xivを参照のこと。

【0126】

他の成分は、二価のカチオン（例えば、 Mg^{+2} または Mn^{+2} ）、ATP再生に必要な物質、リン酸イオンおよび有機溶媒を含み得る。このプロセスに使用される様々な反応体の濃度または量は、反応条件（例えば、温度およびpH値）、ならびにグリコシル化されるアクセプター糖類の選択および量を含む、多数の因子に依存する。反応培地はまた、必要ならば、可溶界面活性剤（例えば、TritonまたはSDS）、および有機溶媒（例えば、メタノールまたはエタノール）を含み得る。

【0127】

上記のプロセスが実行される温度は、ほぼ凝固点からほとんどの感受性酵素が変性する温度までの範囲であり得る。この温度範囲は、好ましくは、約0℃～約110℃、より好ましくは、約20℃～約30℃、または、好熱性生物についてはそれ以上である。

【0128】

そのように形成される反応混合物は、ドナー糖類がアクセプターに添加される

のに十分な時間維持される。産物のいくらかは、しばしば、数時間後に検出され、回収可能な量は、通常、24時間以内に得られる。このプロセスの収率を最適化することが好ましく、そして保守時間は、通常、約36～約240時間である。

【0129】

上記のプロセスによって生成された産物は、精製することなく使用され得る。しかし、通常、この産物を回収することが好ましい。グリコシル化糖類の回収のための標準的な周知の技術（例えば、薄層クロマトグラフィーもしくは厚層クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、または膜濾過）が使用され得る。本明細書中以下、および本明細書中に引用される文献において議論されるように、回収のために膜濾過、より好ましくは、逆浸透膜、または1つ以上のカラムクロマトグラフィー技術を使用することが好ましい。例えば、膜濾過（ここで、この膜は、約3000～約10,000の分子量カットオフを有する）が、タンパク質を除去するために使用され得る。次いで、ナノ濾過（nanofiltration）または逆浸透法が使用されて、塩を除去し、そして／または糖類の産物を精製し得る（例えば、米国特許出願第08/947,775号（1997年10月9日出願）を参照のこと）。ナノ濾過膜は、使用される膜に依存して、一価の塩は透過するが、多価の塩、および約100～約2,000ダルトンより大きい非電荷の溶質は保持するクラスの逆浸透膜である。従って、代表的な用途において、本発明の方法によって調製される糖類は、この膜に保持され、そして混入した塩は通過する。

【0130】

本発明の方法は、大量の所望の糖類の産物を生成し得る。例えば、糖類の産物を、約1mM以上の最終濃度で生成し得る。より好ましくは、糖類の産物は、約2.5mM以上、さらにより好ましくは、約5mM以上の濃度で生成され、そして最も好ましくは、本発明の反応方法は、約10nM以上の濃度で糖類の産物を生成する。

【0131】

別のアプローチにおいて、反応混合物中の、使用される2つ以上の細胞型の各

々は、異なるグリコシルトランスフェラーゼおよび対応するヌクレオチド糖を産生する。本発明の組換え細胞の組み合わせ（この各々は、1つのヌクレオチド糖、または複数のヌクレオチド糖および1つ以上のグリコシド結合を生成する）は、連続してかまたは同時にかのいずれかで組み合わせられて、新しい複数のグリコシド結合を含む糖を生成し得る。従って、本発明は、複数の結合を有するオリゴ糖、または多糖および関連のポリマー構造を生成するための簡単な方法を提供する。

【0132】

生物体において、天然経路を介してかまたは組み込まれたサイクル酵素によってのいずれかで生成される、糖ヌクレオチド、ヌクレオチドまたはPAPSの産生および可能な産生は、生物体の本来の代謝経路を使用して活性化されて、高エネルギー中間体（例えば、PEP、アセチルホスフェート、ATP、クレアチンホスフェートなど）を生成し得るか、または同様の中間体を生成し得る追加の酵素を添加することによって、活性化され得る。従って、再生のためのエネルギーは、単糖（例えば、グルコース、フルクトース、マルトース、スクロースなど）、ポリホスフェート、ピルベート、アルコール、脂肪または脂肪酸、アミノ酸などのような分子により提供される。グリコシルトランスフェラーゼサイクルは、例えば、米国特許第5,876,980号、同第5,728,554号および同第5,922,577号、ならびにPCT特許第96/04790に記載される。

【0133】

いくつかの実施形態において、反応混合物は2つ以上の型の組換え細胞を含む。例えば、サイクル反応に必要なヌクレオチド三リン酸を生成する生物体は、目的のグリコシド結合を生成するために必要な残りのサイクル酵素の全てを含む生物体と合わされ得る（例えば、図8Aおよび8Bを参照のこと）。一旦合わされると、この2つの生物体は、一緒に作用して、このサイクルを完了し、そして目的のヌクレオチド糖を生成する。例示的な例は、UTPを産生する細菌（例えば、*Corynebacterium*）とE. coli株（これは、GlcNAcサイクルの残りの酵素をコードする1つ以上のプラスミドを含む）との組み合わせ

せを含む(表1)。図9Aにおいて、*Corynebacterium*株は、UDPからUTPを自然に生成し、グリコシルトランスフェラーゼ反応の後、*E. coli*における反応によって放出されるUDPは、この*Corynebacterium*に拡散し戻され、ここで、UTPが再生される。2つの生物体は透過され、そして、例えば、グルコース、オロト酸、GlcNAcおよびラクトースの出発試薬が添加され、この例における最終産物は、LNT-2である。図9Bにおいて、*Corynebacterium*は十分なCTPを生成せず、従って、CTPシンセターゼ遺伝子は、CTPの形成を触媒する細胞に導入される。CTPは*E. coli*細胞に拡散され、*E. coli*細胞は、融合タンパク質をコードする外因性遺伝子を含み、この融合タンパク質において、3'-シアリルトランスフェラーゼの触媒ドメインがCMPシアル酸シンセターゼの触媒ドメインに結合される。GluエピメラーゼおよびNeuAcアルドラーゼをコードする遺伝子もまた*E. coli*中に存在する。酵母(例えば、パン酵母)もまた、グルコース、ホスフェートおよびCMPを試薬として使用して、CMPからCTPを再生するために使用され得る。

【0134】

(C. 組換え細胞および反応混合物の用途)

本発明の組換え細胞、反応混合物および方法は、多くの用途を有する広範な糖類の産物を合成するのに有用である。この方法を使用して生成され得る産物には、例えば、二糖類、オリゴ糖、多糖、リボ多糖、糖タンパク質、糖ペプチドおよびガングリオシドを含む糖脂質が挙げられる。任意のグリコシド結合は、このアプローチを使用して作製され得る。このような結合には、フコース、シアル酸、ガラクトース、GlcNAc、GalNAc、マンノース、グルコースのような糖、これらの糖のウロン酸形態(例えば、グルクロン酸、ガラクトツロン酸など)、キシロースおよびフルクトースの添加が挙げられるが、これらに限定されない。

【0135】

本発明の方法および反応混合物を使用して生成され得、特に興味を持たれる糖類の産物には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：

1. オリゴ糖類

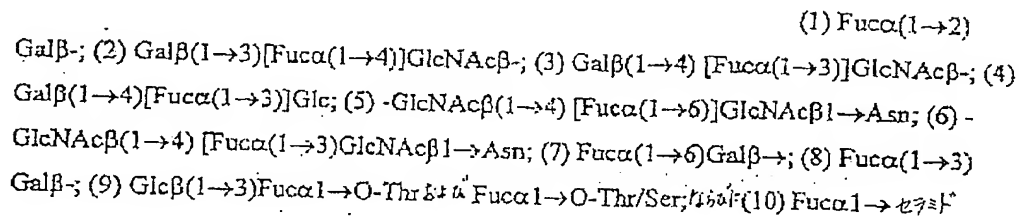
反応混合物および方法は、広範なオリゴ糖類（シアルラクトース、フコシルラクトース、GalNAc-ラクトース、GlcNAc-ラクトース、LN_nT、LNT、LNT-2、フコシル-LN_nT、フコシル-LNT、シアリル-LN_nT（LSTd）、シアリル-LNT、GalNAc-LN_nT、 α 1, 3-Gal-ラクトース、 α 1, 3-Gal-N-アセチルラクトサミン、ST_n-抗原、T_n-抗原、T-抗原、ヘパラン、およびそれらのグリコシドを含む）を生成するのに有用である。これらのグリコシドは、他の物質に結合するためのリンカーアームなどの組み込みを含み得る。

【0136】

いくつかの実施形態において、組換え細胞および反応混合物は、フルコシル化糖類の産物の生成のために構築される。GDP-フコースを生成し、そして適切なフコシルトランスフェラーゼ酵素を含む細胞の使用によって、以下の炭水化物構造は、以下の得られ得る構造に含まれる：

【0137】

[化2]



GDP-フコースを反応体として使用して形成され得る産物の例には、表2に列挙されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

[表2]

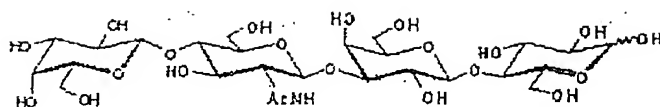
表2: GDP-フコースおよびフコシルトランスフェラーゼを用いて合成されるオリゴ糖構造

オリゴ糖	組織源
Ⅲ ⁹ フコシル-パラ-ラクト-N-ヘキサオース	ヒト乳
3'-シアリル-3-フコシルラクトース	ヒト乳
ルイス X	造血細胞
ルイス A	造血細胞
シアリルルイスX	造血細胞
シアリルルイス A	造血細胞
ラクト-N-ジフコヘキサオース II	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース I	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース II	ヒト乳
2'-フコシルラクトース	ヒト乳
ラクトジフコテトラオース	ヒト乳
3-フコシルラクトース	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース III	ヒト乳
ラクト-N-ジフコヘキサオース I	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース V	ヒト乳

ガラクトシドはまた、本発明の組換え細胞および方法を使用して生成され得る。例えば、UDP-Galを生成し、そして適切なガラクトシルトランスフェラーゼを含む組換え細胞を使用することによって、 β 1,4結合、 α 1,3結合、 α 1,4結合、または β 1,3結合中のGalを、GlcNAcまたはGlc残基を含む糖類に付加し得る。これらの組換え細胞は透過され、そしてアクセプター糖類と接触され、UDP-GALからそのアクセプターへのGalの移動を生じる。本発明が効率的な合成法を提供するそのようなオリゴ糖は、ラクト-N-ネオテトラオース、Gal β (1-4)-GlcNAc β (1-3)-Gal β (1-4)-Glc(式I)である。例えば、Min Yuan Chouら(1996) J. Biol. Chem. 271(32):19166~19173を参照のこと。

【0139】

【化3】



式 I

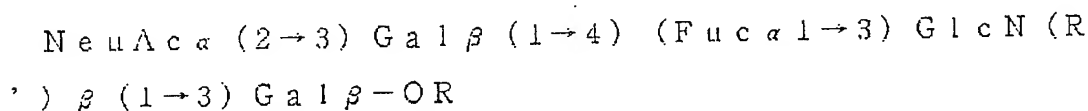
本発明はまた、GalNAcトランスフェラーゼまたはGlcNAcトランスフェラーゼをコードし、そして活性化されたUDP-GalNAcまたはUDP-GlcNAcを生成する組換え細胞を提供することによって、GalNAcまたはGlcNAcを、 β -1, 3結合または β -1, 4結合中のGalに付加するための方法を提供する。これらの細胞は分裂され、Gal残基を含むアクセプター部分に接触して配置される。

【0140】

本発明の組換え細胞および反応混合物は、複数の酵素的段階を必要とする糖類の産物を合成する際に特に有用である。これらの実施形態において、組換え細胞は2つ以上の外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含み得、そして別個のヌクレオチド糖基質の両方を生成し得る。あるいは、反応混合物は、2種類以上の組換え細胞を含み得、これらの組換え細胞の各々は、1つ以上の外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子および対応するヌクレオチド糖産生系を含む。例えば、組換え細胞型の組み合わせを使用し得、その組換え細胞型の一方は、CMP-シアル酸を生成するための外因性シアリルトランスフェラーゼ遺伝子および系を含み、そして他方の組換え細胞型は、外因性ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含み、UDP-Galを生成する。この群の実施形態において、異なる細胞型が、初期の反応混合物と組み合わせられ得るか、または好ましくは、一旦、第1のグリコシルトランスフェラーゼ反応が完了に近づく、第2のグルコシルトランスフェラーゼ反応のための組換え細胞型が反応培地に添加され得る。単一の容器内で順に2つのグリコシルトランスフェラーゼ反応を行うことによって、全収率は中間体種が単離される手順より改善される。さらに、余分な溶媒および副産物の除去および処分が減る。

【0141】

例えば、本発明は、以下の式を有する化合物を調製するための組換え細胞および方法を提供する：



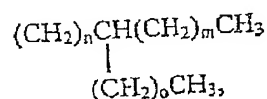
この式において、Rは、水素、糖基、オリゴ糖基、または少なくとも1個の炭素原子を有するアグリコン基である。R'は、アセチルまたはアリルオキシカルボニル(Alloc)のいずれかであり得る。

【0142】

用語「少なくとも1個の炭素原子を有するアグリコン基」とは、 $-A-Z$ 基のことをいい、ここで、Aは、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、酸素、硫黄、アミノ、イミノまたはアルコキシで必要に応じて置換される、1～18個の炭素原子のアルキレン基を表し；そしてZは、水素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}^1$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CONHR}^1$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{CONHNNH}_2$ 、または $-\text{OR}^1$ であり、ここで、各 R^1 は独立して、1～5個の炭素原子のアルキルである。さらに、Rは、

【0143】

【化4】



であり得、ここで、 $n, m, o = 1 \sim 18$ であり； $(\text{CH}_2)_n-\text{R}^2$ （ここで、 $n = 0 \sim 18$ ）において、 R^2 は、多様に置換される芳香族環、好ましくは、1つ以上のアルコキシ基（好ましくは、メトキシまたは $\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ （ここで、 $m = 0 \sim 18$ ））で置換されるフェニル基、またはそれらの組み合わせである。

【0144】

これらの化合物の合成に包含される工程は、

(a) 化合物： $\text{Gal} \beta (1 \rightarrow 4) \text{GlcNR}' \beta (1 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta - \text{OR}$ を形成するのに十分な条件下、UDP-ガラクトースの存在下で、式 $\text{GlcNR}' \beta (1 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta - \text{OR}$ の化合物をガラクトシルトランスフェラーゼを用いてガラクトシル化する工程；

(b) サリチル酸が非還元糖に転移して以下の化合物： $\text{NeuAc} \alpha (2 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta (1 \rightarrow 4) \text{GlcR}' \beta (1 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta - \text{OR}$ を形成する条件下、 $\alpha (2, 3)$ シアリルトランスフェラーゼを使用して、サリチル酸のCMP誘導体の存在下で、(a)で形成される化合物をシアリルトランスフェラーゼでシアリル化する工程；

(c) (b)で形成される化合物をフルコシル化して、 $\text{NeuAc} \alpha (2 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta (1 \rightarrow 4) (\text{Fuc} \alpha 1 \rightarrow 3) \text{GlcNR}' \beta (1 \rightarrow 3) \text{Gal} \beta - \text{OR}$ を提供する工程、を包含する。

【0145】

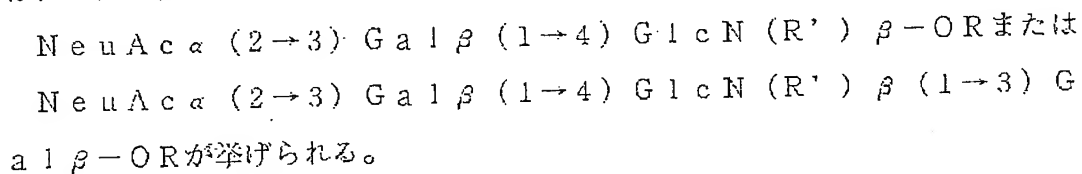
本発明の組換え細胞は、これらの工程の各々を、別々にかまたは同時にのいずれかで行うための効果的な方法を提供する。1つ以上の工程が、本発明の組換え細胞を使用して行われ得る。例えば、ガラクトシル化反応は、外因性ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む組換え細胞を使用して達成され、そしてこの反応はUDP-Galを生成する。シアリル化およびフルコシル化工程はまた、適切なグリコシルトランスフェラーゼおよびドナー糖を生成する組換え細胞を使用して行われ得るか、または従来の非細胞ベースの方法を使用して行われ得る。現在の好ましい実施形態において、少なくとも2つの反応工程が、本発明の組換え細胞を使用して行われる。異なるグルコシルトランスフェラーゼおよび個別のヌクレオチド糖合成系が、同一の細胞内、または外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む異なる組換え細胞内に存在し得、そしてそれぞれのヌクレオチド糖産生系が共に混合され得る。従って、組換え細胞のセットのメンバーを混合およびマッチングすることによって、組換え細胞の各々は、異なるグリコシルトランスフェラーゼおよび対応するヌクレオチド糖産生系を含み、それにより、多くの多工程グリコシル化反応を実施するための慣習的な反応混合物を容易に作成し得る。

【0146】

特に好ましい実施形態において、Rはエチルであり、フコシル化工程は、化学的に実施され、そしてガラクトシル化およびシアリル化工程は、単一の容器内で行われる。

【0147】

化合物のうち、本発明の組換え細胞、反応混合物および方法を使用して生成し得るのは、サリチル酸およびサリチル酸部分を有する任意の糖である。これらには、サリチルガラクトシド（サリチルラクトシドを含む）、ならびに以下の式を有する化合物：

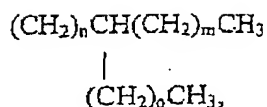


【0148】

これらの式において、R' は、アルキルまたはアシル1～18炭素である、5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-2-ナフトアミド；ベンズアミド；2-ナフトアミド；4-アミノベンズアミド；または4-ニトロベンズアミドである。Rは、水素、アルキルC₁～C₆、糖類、オリゴ糖または少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基である。用語「少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基」とは、-A-Z基のことをいい、ここで、Aは、ハロゲン、チオール、ヒドロキシ、酸素、硫黄、アミノ、イミノまたはアルコキシで必要に応じて置換される1～18個の炭素原子のアルキレン基を表し；そしてZは、水素、-OH、-SH、-NH₂、-NHR¹、-N(R¹)₂、-CO₂H、-CO₂R¹、-CONH₂、-CONHR¹、-CON(R¹)₂、-CONHNH₂、または-OR¹であり、ここで、各R¹は、独立して、1～5個の炭素原子のアルキルである。さらに、Rは、

【0149】

【化5】



であり得、ここで、 $n, m, o = 1 \sim 18$ であり； $(\text{CH}_2)_n - \text{R}^2$ （ここで、 $n = 0 \sim 18$ ）において、 R^2 は、多様に置換される芳香族環、好ましくは、1つ以上のアルコキシ基（好ましくは、メトキシまたは $\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ （ここで、 $m = 0 \sim 18$ ））で置換されるフェニル基、またはそれらの組み合わせである。 R はまた、3-（3, 4, 5-トリメトキシフェニル）プロピルであり得る。

【0150】

一般式に含まれる構造の関連のセットは、Galが $\beta 1, 3$ に結合され、そしてFucが $\alpha 1, 4$ に結合されるものである。例えば、四糖類である、 $\text{NeuAc} \alpha 2, 3 \text{Gal} \beta 1, 3 (\text{Fuc} \alpha 1, 4) \text{GlcNAc} \beta 1$ （ここでSle^aと称される）は、セレクチンレセプターによって認識される。Bergら、J. Biol. Chem., 266:14869~14872 (1991)を参照のこと。特に、Bergらは、E-セレクチンcDNAで形質転換された細胞が、Sle^aを含むネオ糖タンパク質と選択的に結合することを示した。

【0151】

本発明の方法はまた、一般式 $\text{Gal} \alpha 1, 3 \text{Gal} -$ を有するオリゴ糖化合物（ $\text{Gal} \alpha 1, 3 \text{Gal} \beta 1, 4 \text{Glc} 1, 4 \text{Glc} (\text{R}) \beta - \text{O} - \text{R}^1$ ）を含み、ここで、 R^1 は、 $-(\text{CH}_2)_n - \text{COX}$ であり、 $\text{W} = \text{OH}, \text{OR}^2, -\text{NHNH}_2$ であり、 $\text{R} = \text{OH}$ または NAc であり、そして R^2 は、水素、糖類、オリゴ糖または少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基であり、そして n は、2~18、より好ましくは、2~10の整数である）を合成するのに有用である。この化合物のうち、本発明に従って合成され得るものは、ラクトーN-ネオテトラオース（LNnT）、 $\text{GlcNAc} \beta 1, 3 \text{Gal} \beta 1, 4 \text{Glc} (\text{LNT}-2)$ 、シアリル（ $\alpha 2, 3$ ）-ラクトース、およびシアリル（ $\alpha 2, 6$ ）-ラクトースである。

【0152】

上記において、これらの用語は一般に、それらの標準的な意味に従って使用される。本明細書中で使用される用語「アルキル」とは、分枝もしくは非分枝の、飽和もしくは不飽和の、1価もしくは2価の、1～20個の炭素原子を有する炭化水素基を意味し、これには、1～8個の炭素の低級アルキル（例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、ブチル、*n*-ヘキシルなど）、シクロアルキル（3～7炭素）、シクロアルキルメチル（4～8炭素）、およびアリアルアルキルが挙げられる。用語「アルコキシ」とは、酸素によってその分子の残部に結合されたアルキル基（例えば、エトキシ、メトキシ、または*n*-プロポキシ）をいう。用語「アルキルチオ」とは、硫黄によって、その分子の残部に結合されたアルキル基をいう。「アシル」との用語は、ヒドロキシル基の除去によって、有機酸から誘導される基をいう。例には、アセチル、プロピオニル、オレオイル、ミリストイルが挙げられる。

【0153】

用語「アリアル」とは、1原子の除去によって芳香族炭化水素から誘導される基をいう（例えば、ベンゼンからフェニル）。芳香族炭化水素は、1つより多い不飽和炭素環を有し得る（例えば、ナフチル）。

【0154】

用語「アルコキシ」とは、酸素によってその分子の残りに結合されたアルキル基（例えば、エトキシ、メトキシ、または*n*-プロポキシ）をいう。

【0155】

用語「アルキルチオ」とは、硫黄によってその分子の残りに結合されたアルキル基をいう。

【0156】

「アルカノアミド」基は、一般式 —NH—CO— ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル) を有し、置換されていても置換されていなくてもよい。置換されている場合、その置換基は代表的に、ヒドロキシルである。この用語は、特に、2つの好ましい構造、アセトアミド、 —NH—CO—CH_3 、およびヒドロキシアセトアミド、 $\text{—NH—CO—CH}_2\text{—OH}$ を含有する。

【0157】

用語「複素環式化合物」とは、3つ以上の原子を有し、それらの原子のうち少なくとも1つが炭素以外（例えば、N、O、S、Se、PまたはAs）である環化合物をいう。このような化合物の例には、フラン（例えば、フコースのような、ペントースのフリノース形態を含む）、ピラン（例えば、グルコースおよびガラクトースのような、ヘキソースのピラノース形態を含む）、ピリミジン、プリン、ピラジンなどが挙げられる。

【0158】

（2. ガングリオシドおよび関連の構造を含む糖脂質）

本発明の反応混合物および細胞はまた、多くの異なる糖脂質を生成するのに有用である。特に興味を持たれる糖脂質には、例えば、ラクトシルセラミド、グリコシルセラミド、グロボーH、グロボテトロース、リボ多糖、およびそれらの脂質の様々な形態が挙げられる。例えば、この脂質は、例えば、リソ、デアセチル、リンカーアーム含有形態またはO-アセチル形態となるように改変され得る。

【0159】

本発明は、所望のガングリオシドもしくは他のグリコスフィンゴリピド、またはそれらの誘導体を得るために、特定の様式で、1つ以上の糖部分を付加するための反応混合物、細胞型および方法を提供する。本発明の方法は、グリコスフィンゴイド（ガングリオシドおよび他のグリコスフィンゴイドを含む）を合成するための1つ以上の組換えグリコシルトランスフェラーゼを発現する細胞の使用を包含する。所望の炭水化物を前駆体分枝に結合するためのグリコシルトランスフェラーゼの使用によって、高い特異性で所望の結合を達成し得る。いくつかの実施形態において、グリコシルトランスフェラーゼ反応の前に、脂肪酸部分をスフィンゴイド前駆体から除去し、そして／またはこの反応を促進するために有機溶媒を使用することが所望される。多くのガングリオシドおよび関連の構造を生成するための酵素および反応スキームは、同時継続中の、同一人に譲渡されたPCT特許出願PCT/US/25470に記載され、これは1999年6月10日に公報第WO99/28491として、「Enzymatic synthesis of ganglioside」という表題で公表された。

【0160】

本発明の方法は、多くのガングリオシドおよび関連の構造を生成するのに有用である。目的の多くのガングリオシドは、Oettingen, H. F. ら、*Gangliosides and Cancer*, VCH, Germany, 1989, 10~15頁、およびそこで引用される参考文献に記載される。特に関心をもたれるガングリオシドには、例えば、脳および以下の表3に列挙される他の供給源に見出されるものが挙げられる。

【0161】

【表3】

表3: ガングリオシドの式および略語

構造	略語
Neu5Ac3Gal4GlcCer	GM3
GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM2
Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4Gal4GlcCer	GM1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal4GlcCer	GD3
GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD2
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1a
Neu5Ac3Gal3(Neu5Ac6)GalNAc4Gal4GlcCer	GD1a
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1b
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1c
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GQ1b

Nomenclature of Glycolipids, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (Recommendations 1997); *Pure Appl. Chem.* (1997) 69: 2475-2487; *Eur. J. Biochem* (1998) 257: 293-298) (www.chem.qmw.ac.uk/iupac/misc/glylp.html).

(グリコペプチド)

いくつかの実施形態において、糖類の産物は、ポリペプチドに結合される。従って、本発明の反応混合物および細胞は、糖タンパク質を改変して、治療的半減期、免疫原性などのような特性特性の種々の改良を達成するのに有用である。特に関心をもたれるグリコペプチドの例には、例えば、STn-ペプチド、Tn-

ペプチド、T-ペプチド、S.T-ペプチドおよびこれらの構造の結合形態が挙げられる。糖タンパク質の改変に有用な酵素および反応は、例えば、PCT特許出願US98/00835（これは、1998年7月23日にWO98/31826として公開された）に記載される。

【0162】

（4．多糖）

本発明の反応混合物および細胞を使用して合成され得る糖類の産物には、例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、デルマタン、ケラタン、カラゲナン、アルギナート、寒天、グアールガム、フルクタン、グルカン、セルロース、キチン、およびキトサンが挙げられる。これらの産物の各々の誘導体化形態（例えば、脱硫酸化形態、アセチル化形態、無水形態または誘導体化形態）はまた、本発明の組換え細胞、方法および反応混合物を使用して合成され得る。

【0163】

いくつかの実施形態において、組換え細胞および反応混合物は、硫酸化多糖（ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸およびカラゲナン硫酸を含む）を合成するために使用される。多くの生物学的プロセスは、硫酸化生体分子を含む（米国特許第5,919,673号；Varki（1993）*Glycobiology* 3:97）。例えば、ガラクトースの6位にスルフェート基を有するシアリルルイスX（ SLe^x ）は、L-セレクチンに対するリガンドであり（Hemmerichら（1994）*Biochemistry* 33:4830）、そして硫酸化ルイスa（ Le^a ）テトラおよび五糖は、E-セレクチン結合の強力なインヒビターである（Yuenら（1994）*J. Biol. Chem.* 269:1695）。多数の細胞機能に関与する他の硫酸化分子は、グルコサミノグリカンである（van Boeckelら（1993）*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32:1671）。ヒドロキシステロイドの硫酸化は、排出のための親水性形態を与える（Oguraら（1989）*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:169）。細胞表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンは、種々の成長因子、酵素およびプロテアーゼインヒビターを結合し、

生体活性を調節する。ヘパラン硫酸および関連の化合物を合成するため反応混合物および方法は、図11A～11Dに示される。

【0164】

a) 多糖骨格の酵素的合成

本発明は、ヘパリン、ヘパリン硫酸および関連の化合物、ならびに他の関連のない多糖の多糖骨格を合成するための、組換え細胞、反応混合物および方法を提供する。このような多糖骨格は、一般に、2つ以上の糖残基の繰返し単位から構成される。例えば、ヘパリンおよび関連の化合物の多糖骨格は、一般に、グルクロン酸-GlcNAc繰返し単位から構成される。これらの繰返し単位は、本発明の細胞ベースの方法を使用して、酵素的に合成され得る。これらの方法は、アクセプター糖類の非還元末端として、繰返し単位を形成する1つの糖類を有し、グリコシルトランスフェラーゼが繰返し単位の糖類の1つを付加し得る部分で終結する、アクセプター糖類の使用を包含する。ヘパラン硫酸の場合、ヘパラン、および関連の化合物であるアクセプター糖類は、好ましくは、末端グルクロン酸またはGlcNAc残基を有する。ヘパリンの生合成に関与する酵素は、例えば、Salmivirtaら(1996)FASEB J. 10:1270～1279に記載される。

【0165】

繰返し単位は、アクセプター糖類を反応混合物と接触させることによって合成され、この反応混合物は、繰返し糖類の1つに対する糖ドナーとして働き得るヌクレオチド糖（例えば、ヘパラン硫酸および関連の化合物に対するUDP-GlcNAc）を形成するための酵素系を提供する微生物または植物細胞を含有する。この微生物または植物細胞はまた、組換えグリコシルトランスフェラーゼ（例えば、GlcNAcトランスフェラーゼ）を生成し、この組換えグリコシルトランスフェラーゼは、ヌクレオチド糖からアクセプター糖類への糖の転移を触媒して、特定の糖残基において終結するアクセプター糖類を生成する。反応混合物はまた、第2の繰返し糖類のヌクレオチド糖（例えば、ヘパラン硫酸および関連の化合物に対してUDP-グルクロン酸）を形成するための酵素系を提供し、またこの第2の繰返し糖類に対する組換えトランスフェラーゼ（例えば、グルクロン

酸トランスフェラーゼ)を提供する、微生物または植物細胞を含有する。この第2のトランスフェラーゼは、ヌクレオチド糖からアクセプター糖類への第2の繰返し糖類の転移を触媒し、このアクセプター糖類はここで、第1の繰返し糖類で終結される。この反応は、所望の長さの多糖骨格が合成されるまで進行される。特に好ましい実施形態において、ヌクレオチド糖は、本明細書中で記載されるようにヌクレオチド糖の再生サイクルによって生成される。

【0166】

組換えグリコシルトランスフェラーゼおよび対応するヌクレオチド糖合成系は、同一細胞内に存在し得るか、それぞれ異なる細胞型に存在し得る。

【0167】

b) 硫酸化反応

本発明はまた、硫酸化化合物(ヘパリン硫酸、ヘパリン硫酸およびカラゲニンのような硫酸化多糖を含む)を生成する方法を提供する。例えば、ヘパリン、ヘパリン硫酸および関連の化合物を合成するための方法は、ヘパリン多糖骨格を、以下を含む微生物または植物細胞を含有する反応混合物と接触させる工程を包含する：

a) PAPSを形成するための酵素系；および

b) 組換えスルホトランスフェラーゼであって、そのPAPSからヘパリン多糖骨格へのスルフェートの転移を触媒して、N-硫酸化多糖を生成する、組換えスルホトランスフェラーゼ。

【0168】

好ましくは、硫酸化反応は、スルフェートドナーPAPS(3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート)を効果的に生成し得る細胞を用いる。PAPSは、スルホトランスフェラーゼに対するスルフェートドナーとして働き得、このスルホトランスフェラーゼは、オリゴ糖およびステロイドの硫酸化を触媒し得る。米国特許第5,919,673号は、いくつかの酵素の使用を含むPAPS再生サイクルを記載する(図10)。PAPS再生サイクルが使用される本発明の反応スキームの例は、図11A~Dに示される。このアプローチは、硫酸化糖を生成するための活性化硫酸化剤、PAPSを生成するために使用され得る(

例えば、図11A～Dを参照のこと）。

【0169】

スルホトランスフェラーゼに加えてPAPS再生サイクルの酵素を提供する細胞は、本発明の現存の好ましい実施形態において使用される。1つのスルホトランスフェラーゼまたは複数のスルホトランスフェラーゼをコードする遺伝子の、PAPSを生成する生物体への組み込みは、自然にまたはPAPSサイクル再生酵素の添加によってのいずれかで、オリゴ糖または多糖の硫酸化を可能にする。このプロセスは、硫酸化される糖をこのPAPS硫酸化生物体に添加することによって、またはPAPS含有生物体を、目的の糖のグリコシド結合を形成し得る他の生物体に添加することによって、行われ得る。PAPS酵素は、生物体へのゲノム挿入によってか、目的の酵素活性を生成し得るプラスミドを介してのいずれかで導入され得る。例のように、PAPSサイクル酵素、およびヘパリンまたはヘパリンの硫酸化に必要な3つのスルホトランスフェラーゼが生物体に添加され、そしてヘパランまたはヘパリンのいずれかの硫酸化されていない多糖骨格が、適切な条件下でこの生物体に添加される場合、この多糖は硫酸化されて、硫酸化ヘパランまたはヘパリンを生成する。

【0170】

c) グルクロン酸のエピマー化

ヘパリン硫酸、ヘパリンおよび関連の化合物を生成するために、本発明の方法は、N-硫酸化多糖をグルクロン酸C5-エピメラーゼに接触させて、多糖骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基をイズロン酸に変換する工程をさらに包含し得る。現在の好ましい実施形態において、グルクロン酸C5-エピメラーゼは、反応混合物中に存在し、そしてこのエピメラーゼをコードする遺伝子を発現する細胞によって提供される。哺乳動物のグルクロン酸C5-エピマーをコードする核酸は、例えば、PCT出願第SE98/00703号（1998年10月29日に、WO98/48006として公開された）に記載される。

【0171】

d) O-硫酸化

最後に、いくつかの実施形態において、1つ以上のイズロン酸残基が、イズロ

ン酸含有N-硫酸化多糖を1つ以上のO-スルホトランスフェラーゼと接触させ、その結果、ヘパラン硫酸または関連の化合物を形成することによって、O-硫酸化される。また、現在の好ましい実施形態において、O-スルホトランスフェラーゼおよびPAPS再生系は、反応混合物中に存在する組換え細胞型によって提供される。適切なO-スルホトランスフェラーゼは、例えば、PCT出願第US98/22597号（1999年5月6日に、WO9922005として公開された）；ならびに米国特許第5,834,282号、同第5,817,487号、同第5,877,713号、同第5,773,274号、および同第5,541,095号に記載される。

【0172】

（5. 医薬品および他の用途）

次いで、上記の化合物は様々な用途、例えば、抗原、診断薬、食材としてまたは治療剤として使用され得る。従って、本発明はまた、様々な状態の処置において使用され得る薬学的組成物を提供する。薬学的組成物は、上記の方法に従って作製されるオリゴ糖から構成される。

【0173】

本発明の薬学的組成物は、様々な薬物送達システムにおける使用に適切である。本発明における使用に適切な処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版（1985）に見出される。薬物送達に付いての方法の簡単な総説については、Langer, Science 249:1527~1533（1993）を参照のこと。

【0174】

薬学的組成物は、予防的および／または治療的処置のための、例えば、エアロゾルによる非経口、鼻腔内、局所的、経口または局部投与、あるいは、経皮的投与が意図される。一般に、薬学的組成物は、非経口的（例えば、静脈内）二糖よされる。従って、本発明は、受容可能なキャリア、好ましくは水性キャリア（例えば、水、緩衝水、生理食塩水、PBSなど）に溶解または懸濁された化合物を含む、非経口投与のための組成物を提供する。これらの組成物は、適切な生理

学的条件に必要とされるような薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調整剤および緩衝剤、張度調整剤、湿潤剤、界面活性剤など）を含み得る。

【0175】

これらの組成物は、従来の殺菌技術によって殺菌され得るか、または殺菌濾過され得る。得られる水溶液は、使用のため、そのままパッケージングされ得るか、または凍結乾燥され、その凍結乾燥された調製物は投与の前に殺菌水性キャリアと合わされる。この調製物のpHは、代表的に、3と11との間、より好ましくは、5～9、そして最も好ましくは、7～9である。

【0176】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴ糖は、標準的なベシクル形成脂質から形成されるリポソームに組み込まれ得る。Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)、米国特許第4, 235, 871号、同第4, 501, 728号および同第4, 837, 028号に記載されるような、様々な方法が、リポソームを調製するために利用可能である。様々な標的化剤（例えば、本発明のシアリルガラクトシド）を使用するリポソームの標的化は、当該分野で周知である（例えば、米国特許第4, 957, 773号および同第4, 603, 004号を参照のこと）。

【0177】

オリゴ糖を含む組成物は、予防的および／または治療的処置のために投与され得る。治療的用途において、組成物は、すでに上記のような疾患を罹患している患者に、その疾患およびその合併症の症状を治癒するかまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は、「治療的有效用量」として定義される。この用途に有効な量は、その疾患の重症度、ならびに患者の体重および全身状態に依存するが、一般的には、70kgの患者について、1日あたり約0.5mgから約40gのオリゴ糖の範囲であり、1日あたり約5mg～約20gの化合物の投薬量が、より一般的に使用される。

【0178】

この組成物の単一のまたは複数の投与が、処置する医師により選択される用量レベルおよびパターンで実施され得る。いずれにしても、薬学的処方物は、その

患者を効果的に処置するのに十分な本発明のオリゴ糖の量を提供しなければならない。

【0179】

オリゴ糖はまた、診断薬としての用途を見出し得る。例えば、標識化合物が、炎症の疑いのある患者における炎症または腫瘍転移の領域を位置決めするために使用され得る。この用途について、この化合物は適切な放射性同位体（例えば、 ^{125}I 、 ^{14}C またはチタン）で標識化され得る。

【0180】

本発明のオリゴ糖は、本発明の化合物と特異的に反応性のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生成するための免疫原として使用され得る。種々の免疫グロブリン分子の生成および操作のために当業者が利用可能な多くの技術が、本発明で使用され得る。抗体は、当該分野で周知の様々な手段により生成され得る。

【0181】

非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス、ウサギ、ウマなど）の生成は、周知であり、そして例えば、その動物を、本発明のオリゴ糖を含有する調製物で免疫化することによって達成され得る。その免疫化された動物から得られる抗体産生細胞は、不死化されそしてスクリーニングされるか、または初めに所望の抗体の産生についてスクリーニングされ、次いで不朽化される。モノクローナル抗体産生の一般手順の議論については、HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988)を参照のこと。

【0182】

以下の実施例は、単に例示の目的で提供され、そして本発明を制限も規定もしないことが意図される。

【0183】

(実施例1)

(CMP-シアル酸シンセターゼ/ $\alpha 2, 3$ シアルルトランスフェラーゼ融合

タンパク質の発現)

この実施例は、CMP-シアル酸シンセターゼ/ α 2, 3シアリルトランスフェラーゼ融合タンパク質を発現し、比較的安価に3'-シアリルラクトースを産生する単一の細胞型の使用を記載する。このアプローチは、図1に概略的に示される。

【0184】

(A. 細胞はCMP-シアル酸を過剰発現する)

CMP-シアル酸 (CMP-NAN) を産生するように遺伝子操作した *E. coli* (*E. coli* 240) の株 (*nana neuS::TN10* 変異) を、IPTG 誘導 CMP-NAN シンセターゼ/ α 2, 3シアリルトランスフェラーゼ融合タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミド DNA と形質転換した。LB 培地中の 1 L の培養液を、2~3 の OD₆₀₀ まで増殖し、20℃に移し、そして IPTG で 16 時間誘導した。この培養液を収集し、細胞ペレットを遠心分離によって回収した。次いで、7 g の細胞ペレットを以下の透過化処理溶液と混合して反応を開始した：250 mM ガラクトース、250 mM フルクトース、10 mM ラクトース、100 mM KH₂PO₄、20 mM MgSO₄·7H₂O (pH 7.0) および 1% キシレン。

【0185】

3'-シアリルラクトースの生成を、TLC および HPLC でモニターした。43 時間後、反応混合物は、TLC (シリカ、イソプロパノール：NH₄OH：H₂O (7：1：2)、オシノールで可視化)；R_f = 0.8、および HPLC (BioRad Aminex カラム HPLX-87H、H₂O 中 4 mM の硫酸)；R_t = 6.3 分により測定すると、2.2 mg/mL の産物を生成した。

【0186】

(B. シアル酸および CTP を補充した反応混合物)

この実施例において、実施例 1 の反応に対する透過化溶液 (これは 10 mM のシアル酸および 10 mM の CTP が追加される) の効果を試験する。実施例 1 で記載された細胞培養液を、250 mM ガラクトース、250 mM フルクトース、10 mM ラクトース、100 mM KH₂PO₄、20 mM MgSO₄・

7 H₂O、pH 7.0、1% キシレンの透過化溶液（これは、10 mM シアル酸および10 mM CTPが補充される）と混合する。反応を、実施例1に記載されるように、TLCおよびHPLCによりモニタースする。反応混合物に追加のシアル酸およびCTPを追加することによって、組換えE. coli細胞において利用可能であるより高いレベルのCMP-NANが生じ、従って、より高いレベルの3'-シアリルラクトース産物が導かれる。

【0187】

（C. CMP-シアル酸を過剰産生しないE. coli細胞の使用）

この実施例において、CMP-シアル酸シンセターゼ/ α 2, 3シアリルトランスフェラーゼ融合タンパク質は、CMP-シアル酸を過剰産生しないE. coli株において発現する。

【0188】

2, 3-シアリルトランスフェラーゼおよびCMPシアル酸シンセターゼの触媒ドメインを含む、融合タンパク質を発現したAD202 E. coliの100 mLの培養液を、37℃、200 rpmにて振盪機で増殖させた。融合タンパク質の発現を、この培養液が0.85に等しいOD₆₀₀に到達するとすぐ、IPTGを用いて誘導する。この培養液を、30℃で一晩インキュベートした。約2.0 gの細菌細胞ペーストを、この培養液から収集した。

【0189】

0.1 M HEPES (pH 7.5) を含む溶液を調製し、そして沸騰するまで加熱し、その後、1%のキシレンを添加した。この溶液を約37℃まで冷却した後、10 mM ラクトース、10 mM CTPおよび10 mM シアル酸を添加した。次いで、この溶液を、2.0 gの細菌細胞ペーストと完全に混合し、そして150 rpmにて振盪機で、37℃で一晩インキュベートした。

【0190】

この反応によって形成されるシアルラクトースの量は、薄層クロマトグラフィ（TLC）およびHPLCによってモニターした。44時間後、TLC（シリカ；イソプロパノール/NH₄OH/H₂O（7/1/2）、オルシノールにより可視化、R_f=0.8）およびHPLC（BioRad Aminexカラム

HPX-87H、H₂O中4 mMの硫酸、R_t=6.3分)で決定したところ、全てのラクトースが消費され、そして残りの3'-シアリルラクトースの濃度は、7.04 mMであった(収率70%)。

【0191】

(実施例2)

この実施例は、2種の生物体が使用されるシアリル化糖類を合成するためのアプローチを記載する。これらのアプローチの1つの概略的な表示は、図9Bに示される。CTPが酵母または*Corynebacterium*のような生物体によって産生されることを除いて、反応混合物は、実施例1に記載されるものと同様である。

【0192】

CMP-NANを過剰発現するように遺伝子操作された*E. coli*の株(EV240) (*nana neuS::Tn10*変異)を、IPTG誘導CMP-シアル酸シンセターゼ/ α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ融合タンパク質をコードするプラスミドDNAで形質転換する。これらの細菌の培養液を増殖し、そして融合タンパク質を作製するように誘導する。反応を開始するために、1% キシレン、250 mM グルコース、250 mM フルクトース、25 mM ラクトース、20 mM MgSO₄·7H₂O (pH 7.0)、100 mM K₂HPO₄ (pH 7)、10 mM シアル酸、触媒量のCMPを含有する溶液に、細胞ペレットを添加する。この溶液はまた、20% (w/v) パン酵母を含有する。酵母は、シアル酸サイクルで使用されるヌクレオチドCTPを産生および再生するために使用される(フルクトース、グルコース、およびCMPが、このCTPを産生するために、酵母により使用される)。E. coliによって発現される融合タンパク質のCMP-NANシンセターゼ触媒ドメインは、CTPおよびNANからCMP-NANを産生し、次いで、シアリルトランスフェラーゼ触媒ドメインは、3'-シアリルラクトースを再生する。

【0193】

この反応は、実施例1に記載されるようにモニターされ、完了すると、標準的な手順および技術により精製される。

【0194】

UTPを過剰発現し、またCMPシンセターゼ遺伝子を発現する任意の生物体（例えば、*Corynebacterium*）と同様に、CTPを産生する任意の生物体がこのアプローチで使用され得る。外因性ミオキナーゼが反応混合物に添加され得、またはミオキナーゼを発現する酵母が、CTPの生成を触媒するのに助けるために使用され得る。

【0195】

（実施例3）

この実施例は、GlcNAcからCMPシアル酸の合成に関する酵素をコードする外因性遺伝子を含む細胞多型の使用を記載する。図9Bを参照のこと。

【0196】

α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ/CMPシアル酸シンセターゼ融合タンパク質、GlcNAc 2'-エピメラーゼおよびシアル酸アルドラーゼを発現する*E. coli*株JM101の培養液を増殖し、これらの酵素を発現するように誘導する。細胞ペーストを収集し、そしてこの反応を開始するために、この細胞ペーストを、GlcNAc、ピルベート、ラクトース、CTP、ならびに緩衝液および他の試薬を含む溶液に添加する。

【0197】

この反応の産物である、3'-シアリルラクトースの形成を、TLCまたはHPLCでモニターし、そしてこの反応が完了した時、3'-シアリルラクトースを標準的な技術および手順で単離する。

【0198】

添加したCTPの代わりに、酵母または*Corynebacterium*（CTPシンセターゼのための遺伝子が発現する）が、実施例2に記載されるものと同様の反応で使用されるCTPを産生および再生するために使用され得る。

【0199】

（実施例4）

この実施例において、 α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ/CMPシアル酸シンセターゼ融合タンパク質のみを発現する*E. coli*株が、CTPを産生

するパン酵母と共に使用される。

【0200】

α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ/CMPシアル酸シンセターゼ融合タンパク質を発現するAD202細菌の培養液を増殖し、そしてこの融合タンパク質を発現するように誘導する。細胞ペーストを収集し、そして250mM グルコース、250mM フルクトース、25mM ラクトース、20mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.0)、100mM KH_2PO_4 (pH 7)、10mM シアル酸、1% キシレン、5mM CMPおよび20% (w/v) パン酵母を含有する溶液に添加し、反応を開始する。この反応を、TLCおよびHPLCでモニターし、産物の生成を追跡する。反応が完了すると、その産物を、標準的な技術および手順で精製する。

【0201】

(実施例5)

この実施例において、シアル酸を過剰産生する株である、*E. coli*株EV5を使用する。*E. coli*株を、シアリルトランスフェラーゼ/CMP-シアル酸シンセターゼ融合タンパク質をコードするプラスミドで形質転換する。一旦、この培養液を増殖し、プラスミド産物が発現すると、これらの細胞を収集し、そして、250mM ガラクトース、250mM フルクトース、10mM ラクトース、100mM KH_2PO_4 、10mM CTP、1%キシレン、および20mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.0)を含有する溶液を添加して、この反応を開始する。3'-シアリルラクトースの生成を、実施例1に記載されるようにモニターし、そして当業者に公知の手順およびプロトコルにより精製する。

【0202】

添加されるCTPの代わりに、酵母または*Corynebacterium* (CTP-シンセターゼのための遺伝子を発現する)を、実施例2に記載されるもの同様の様式の反応において、CTPを産生および再生するために使用し得る。

【0203】

(実施例6)

この実施例における反応は、ヌクレオチド、ヌクレオチド糖を産生し、そして糖類のアクセプター糖類への転移を触媒する単一の生物体を使用する。 α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼ/CMPシアル酸シンセターゼ融合タンパク質、およびCTP-シンセターゼを発現する*Corynebacterium*の培養液を増殖し、そしてこれらの酵素を発現するように誘導する。次いで、細胞ペーストを収集し、ラクトース、ガラクトース、オロト酸、シアル酸、ならびに緩衝液および他の試薬を含有する溶液に添加する。反応の産物である、3'-シアリルラクトンの形成を、TLCまたはHPLCでモニターし、完了すると、標準的な技術および手順により単離する。

【0204】

(実施例7)

この実施例は、三糖類のGal α 1, 3Gal β 1, 4-GlcNAcを産生するのに必要な酵素を発現する生物体の使用を記載する。この生物体は、ガラクトシルトランスフェラーゼサイクルの酵素をコードする外因性遺伝子を含む。図9.Aを参照のこと。

【0205】

UDP-グルコースピロホスホリラーゼ、UDP-グルコース-4'-エピメラーゼ、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、および α 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼを発現する*Corynebacterium*の培養液を増殖し、これらの酵素を発現するように誘導する。次いで、反応を開始するために、GlcNAc、オロト酸、緩衝液および他の試薬を含有する溶液を、この細胞ペーストに添加する。産物である、三糖類のGal α 1-3Gal β 1-4-GlcNAcの形成を、TLCおよびHPLCでモニターし、完了すると、この産物を標準的な技術によって単離する。

【0206】

本明細書中に記載される実施例および実施形態は、例示の目的のためのみであり、これらを考慮した種々の改変または変更が当業者に提案され、そして本明細書および添付の特許請求の範囲の精神ならびに範囲内に含まれることが理解される。本明細書中で引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、全ての目的

のために、本明細書中で参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1Aは、対応するヌクレオチド糖が糖類の産物を産生するために用いられるのに加えて、単一の外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する細胞の例を示す（この例において、それぞれ3' - および6' - シアリルラクトースが産生される）。図1Aに示される *E. coli* 細胞は、3' - シアリルトランスフェラーゼをコードする外因性遺伝子を含み、そしてCMP - シアル酸（CMP - SA）を天然に存在する特定の株である。

【図1B】

図1Bは、対応するヌクレオチド糖が糖類の産物を産生するために用いられるのに加えて、単一の外因性グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する細胞の例を示す（この例において、それぞれ3' - および6' - シアリルラクトースが産生される）。図1Bにおいて、*E. coli* 細胞は、外因性6' - シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を含み、そしてこの株は十分量のCMP - シアル酸を天然に産生しないので、この種もまた、外因性CMP - シアル酸シンセターゼ遺伝子を含む。これらの酵素の発現ならびに反応混合物へのラクトースおよび他に必要な反応基質の添加において、所望のシアリルラクトースは合成される。

【図2】

図2は、グリコシルトランスフェラーゼ発現細胞が多様なヌクレオチド糖を産生するという、細胞に基づく酵素的合成のスキームの例を示す。複数のヌクレオチド糖が細胞によって産生されるので、細胞は、複数の外因性グリコシルトランスフェラーゼを発現するように設計され得る。従って、複数のグリコシドの連結が必要である産物は、単一の生物を用いて合成され得る。この特定の例において、2つの異なるグリコシルトランスフェラーゼをコードする外因性遺伝子である *GlcNAc* トランスフェラーゼおよびガラクトシルトランスフェラーゼは、これら2つの酵素に関するそれぞれのヌクレオチド糖ドナーであるUDP - *GlcNAc* およびUDP - *Gal* を天然に存在する *E. coli* に導入される。この2つのグリコシルトランスフェラーゼの発現において、アクセプター糖類および

他の要求される反応物は、糖類の産物、ラクトーN-ネオテトラオース (neotetraose) (LNnT) を産生するために細胞に添加される。

【図3】

図3は、米国特許第5,922,577号に記載されるような、N-アセチル-グルコサミドトランスフェラーゼサイクルを例示する。

【図4】

図4は、UDP-ガラクトースサイクルを示す。

【図5】

図5は、GDP-フコースサイクルを示す。

【図6】

図6は、UDP-GlcNAcサイクルを示す。

【図7】

図7は、CMP-シアル酸サイクルを示す。

【図8A】

図8Aは、グリコシルトランスフェラーゼ発現細胞が十分量の対応するヌクレオチド糖またはヌクレオチドを産生しない場合のアプローチの例を示す。これは、糖ヌクレオチド再生サイクルのいくつかの酵素または全ての酵素をコードする遺伝子を細胞内に導入することによって克服する。示される特定の酵素は、外因性遺伝子によってコードされる β 1,4-GalNAcトランスフェラーゼを発現するE. coli細胞を用いるGalNAc- β 1,4-ラクトースの産生を含む。E. coli細胞が十分量のUDP-GalNAcヌクレオチド糖ドナーまたはUTPを産生しないので、UDP-GlcNAcサイクルに関する酵素（図3に示される）は、GalNAcトランスフェラーゼ遺伝子に加えて細胞内に導入される。図8Aにおいて、E. coli細胞におけるUDP-GlcNAc産生のシステムは、UDP-GalNAcエピメラーゼ、UDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ、GlcNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼおよびピルビン酸キナーゼが挙げられる。

【図8B】

図8Bは、グリコシルトランスフェラーゼ発現細胞が十分量の対応するヌクレ

オリゴ糖またはヌクレオチドを産生しない場合のアプローチの例を示す。これは、糖ヌクレオチド再生サイクルのいくつかの酵素または全ての酵素をコードする遺伝子を細胞内に導入することによって克服する。示される特定の酵素は、外因性遺伝子によってコードされる β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼを発現する*E. coli*細胞を用いるGalNAc- β 1, 4-ラクトースの産生を含む。*E. coli*細胞が十分量のUDP-GalNAcヌクレオチド糖ドナーまたはUTPを産生しないので、UDP-GlcNAcサイクルに関する酵素（図3に示される）は、GalNAcトランスフェラーゼ遺伝子に加えて細胞内に導入される。図8Bは、UDP-GalNAcの生合成のための代替の経路の使用を示し、これは、酵素UDP-GalNAcピロホスホリラーゼ、GalNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼおよびピルビン酸キナーゼが挙げられる。これらの酵素のそれぞれをコードする遺伝子は、GalNAcトランスフェラーゼに対する遺伝子を伴って*E. coli*細胞内に導入される。これらの酵素は、反応基質（アクセプターとしてのラクトースを含む）が添加された後に発現される。

【図9A】

図9Aは、2つの型の生物がヌクレオチド糖を産生するために用いられる場合の例のスキームを示す。それぞれの場合において、1つの細胞型（*Corynebacterium*）はヌクレオチドを産生し、そして他の細胞型は糖のヌクレオチドへの付加を触媒しヌクレオチド糖を形成する。第二の細胞型はまた、対応するグリコシルトランスフェラーゼを発現し、これは、外因性遺伝子によってコードされる。図9Aにおいて、所望の反応産物は、 α -1, 3-Gal-LacNAcである。この反応混合物は、例えば、天然にUDPからUTPを合成する*Corynebacterium*または酵母を含む。第二の細胞型によって、UTPは活性化され、UDP-ガラクトースを形成し、これは、GlcNAcサイクルの残存する酵素（すなわちUDP-Gal-4'エピメラーゼ、UDP-Glcピロホスホリラーゼ、ヘキソキナーゼおよびホスホグルコムターゼ）をコードする外因性遺伝子を含む。 α 1, 3-Galトランスフェラーゼをコードする外因性遺伝子もまた、第二の細胞型に存在する。*Corynebacterium*

mまたは酵母によって産生されるUTPは、*E. coli*細胞に侵入し、そしてサイクル酵素によってUDP-Galに変換され、次いで、反応混合物中にまた存在するLacNAcアクセプターへのガラクトシルトランスフェラーゼ媒介移行に関するドナーとして働く。この反応は、*Corynebacterium*または酵母を通ることによって再利用されるUDPを放出し、ここで、リン酸化されてUTPになる。

【図9B】

図9Bは、2つ型の生物がヌクレオチド糖を産生するために用いられる場合の例のスキームを示す。それぞれの場合において、1つの細胞型(*Corynebacterium*)はヌクレオチドを産生し、そして他の細胞型は糖のヌクレオチドへの付加を触媒しヌクレオチド糖を形成する。第二の細胞型はまた、対応するグリコシルトランスフェラーゼを発現し、これは、外因性遺伝子によってコードされる。図9Bに示されるスキームは、3'-シアリルラクトースを産生するために有用である。*Corynebacterium*または酵母は、CMPシンセターゼをコードする外因性遺伝子の導入によってCTPを産生するように設計された細胞とともに、ヌクレオチド糖を必要とするヌクレオチドを産生するために再度用いられる。*E. coli*細胞は、CTPからのCMP-シアル酸合成に含まれる酵素を発現する：この場合において、CMP-シアル酸シンセターゼは、3'-シアリルトランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現される。GlcNAcエピメラーゼ酵素およびNeuAcアルドラーゼ酵素もまた、産生される。この経路は、CTPをCMP-シアル酸に変換し、次いでこの経路は、シアル酸のラクトースアクセプター部分への移行に関するドナーとして働く。

【図10】

図10は、スルホトランスフェラーゼに関するドナーとして働くPAPSの産生に関する酵素的サイクルの図表を示す。この図は、米国特許第5,919,673号由来であり、これは、PAPSサイクルの詳細な説明を提供する。簡単には、PAPSサイクルは、スルホトランスフェラーゼはスルフェート基のPAPSからアクセプター部分への移行を触媒するが、リン酸化されたアデノシン含有部分(AMP、ADP、ATP、APS、PAPS、およびPAP)が再利用さ

れる場合の単一のポット反応システムを提供する。図において、「PEP」はホスホエノールピルベートを言及し、そして「Pyr」はピルベートを言及する。

【図11A】

図11Aは、活性なスルフェート化剤PAPSに関する再生系の酵素を発現するように設計される細胞を使用する反応スキームの例を例示する。スルホトランスフェラーゼと組み合わせて用いられる場合、これらの細胞は、スルフェート化糖を産生し得る。示される特定の例は、ヘパリンまたはヘパランの産生のためのタバコ細胞の使用を含む。大規模合成のための十分量のPAPSを天然には産生しないタバコ細胞は、PAPSサイクル酵素遺伝子、および3'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、6'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、2'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、イズロニルエピメラーゼ遺伝子、ならびにイズロニル-N-スルホトランスフェラーゼ遺伝子を含むように設計される。図11Aにおいて、精製されたK5多糖はアクセプターとして用いられ、得られる産物はヘパリン硫酸である。

【図11B】

図11Bは、活性なスルフェート化剤PAPSに関する再生系の酵素を発現するように設計される細胞を使用する反応スキームの例を例示する。スルホトランスフェラーゼと組み合わせて用いられる場合、これらの細胞は、スルフェート化糖を産生し得る。示される特定の例は、ヘパリンまたはヘパランの産生のためのタバコ細胞の使用を含む。大規模合成のための十分量のPAPSを天然には産生しないタバコ細胞は、PAPSサイクル酵素遺伝子、および3'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、6'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、2'-スルホトランスフェラーゼ遺伝子、イズロニルエピメラーゼ遺伝子、ならびにイズロニル-N-スルホトランスフェラーゼ遺伝子を含むように設計される。図11Bは、単離型として提供されるよりも、反応混合物中に含まれる第二の細胞型によって産生されるK5多糖を伴う、このスキームの変形である。

【図11C】

図11Cは、活性なスルフェート化剤PAPSに関する再生系の酵素を発現するように設計される細胞を使用する反応スキームの例を例示する。スルホトラ

ンスフュラーゼと組み合わせて用いられる場合、これらの細胞は、スルフェート化糖を産生し得る。示される特定の例は、ヘパリンまたはヘパランの産生のためのタバコ細胞の使用を含む。大規模合成のための十分量のPAPSを天然には産生しないタバコ細胞は、PAPSサイクル酵素遺伝子、および3'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、6'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、2'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、イズロニルエピメラーゼ遺伝子、ならびにイズロニル-N-スルホトランスフュラーゼ遺伝子を含むように設計される。図11Cは、外因性の β 1, 4-GlcNAcトランスフュラーゼ、 β 1, 4-グルクロニルトランスフュラーゼおよびUDP-Glcデヒドロゲナーゼに関するドナー糖として働くUDP-GlcNAcおよびUDP-Glcを産生する酵母細胞または細菌細胞によって、ヘパリンコア多糖が産生される場合の別の変形を示す。次いで、酵母細胞または細菌細胞によって産生される得られたヘパリンコア多糖は、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、PAPSを産生する細胞に添加される。

【図11D】

図11Dは、活性なスルフェート化薬剤PAPSに関する再生系の酵素を発現するように設計される細胞を使用する反応スキームの例を例示する。スルホトランスフュラーゼと組み合わせて用いられる場合、これらの細胞は、スルフェート化糖を産生し得る。示される特定の例は、ヘパリンまたはヘパランの産生のためのタバコ細胞の使用を含む。大規模合成のための十分量のPAPSを天然には産生しないタバコ細胞は、PAPSサイクル酵素遺伝子、および3'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、6'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、2'-スルホトランスフュラーゼ遺伝子、イズロニルエピメラーゼ遺伝子、ならびにイズロニル-N-スルホトランスフュラーゼ遺伝子を含むように設計される。図11Dは、ヘパラン硫酸産生に関するこのスキームのさらに別の変形を示す。PAPSサイクル酵素を発現する*Aspergillus niger*は、十分量のATPまたはPAPSサイクル薬剤を産生しない。十分なATPを産生するために、第三の細胞型（例えば、酵母）が反応混合物に含まれる。

【図12】

図12は、リソ−グルコシルセラミドアクセプターまたはラクトシルセラミドアクセプターからのガングリオシドGM₂ (GalNAc β 4 (Neu5Ac α 3) Gal β 4 GlcCer) の3工程の酵素的合成に関する細胞に基づく反応システムの例を例示する。この反応は、アクセプターのガラクトシル化、引き続いてGalNAc残基のガラクトースへの付加を含む。最後に、シアル酸が付加される。例示された反応スキームにおいて、UDP-GalNAcおよびUDP-Galを天然に存在する細胞は、外因性遺伝子由来の β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼおよび β 1, 4-Galトランスフェラーゼを発現するように設計される。これらの細胞は、CTPを天然に産生しかつCMP-シアル酸の合成に関して必要な酵素をコードする外因性遺伝子を含む第二の細胞型（例えば、*Corynebacterium*または酵母）と共に反応混合物に導入される。CMP-シアル酸合成に関する外因性遺伝子は、CMP-シアル酸シンセターゼ、GlcNAcエピメラーゼ、NeuAcアルドラーゼ、およびCMP-シンセターゼが挙げられる。第二の細胞型もまた、外因性遺伝子によってコードされる α 2, 3-シアルルトランスフェラーゼを発現する。

【図13】

図13は、ガングリオシドGD₂ (GalNAc β 4 (Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3) -Gal β 4 GlcCer) の酵素的合成に関する細胞ベースの反応のスキームの1例を示す。このプロセスは、リソ−グルコシルセラミドアクセプターまたはラクトシルセラミドアクセプターからGD₂を産生する4つの酵素的反応工程を含む。図12に示すように、2つの細胞型が用いられ、1つは、外因性 α 2, 3-シアルルトランスフェラーゼおよび外因性 α 2, 8-シアルルトランスフェラーゼ、ならびに糖ヌクレオチドCMP-シアル酸を産生し、そして別の細胞型は、 β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼおよび β 1, 4-Galトランスフェラーゼをコードする外因性の遺伝子を含む。この細胞型は、これら2つのグリコシルトランスフェラーゼ、UDP-GalNAcおよびUDP-Galに関するそれぞれのヌクレオチド糖ドナーを天然に存在する。アクセプター分子および他の必要な反応基質の添加に際して、GD₂は、4つの酵素の各々の連続する反応によって産生される。

【図14】

図14は、3'-シアリル-LNnT (LSTd) の合成に関する細胞ベースの反応のスキームの例を示す。2つの細胞型が用いられる。本例における第一の細胞型であるE. coliは、ヌクレオチド糖UDP-GlcNAcおよびUDP-Galを天然に存在する。 β 1, 3-GalNAcトランスフェラーゼおよび β 1, 4-Galトランスフェラーゼをコードする外因性の遺伝子を、細胞内に導入する。第二の細胞型は、 α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼをコードする外来生の遺伝子を含み、そして、要求される糖ドナーであるCMP-シアル酸をまた産生する。両方の細胞型を反応混合物に、アクセプターとしてのラクトースおよび他の要求される反応物を伴って導入することは、LSTdの産生を生じる。

【図15A】

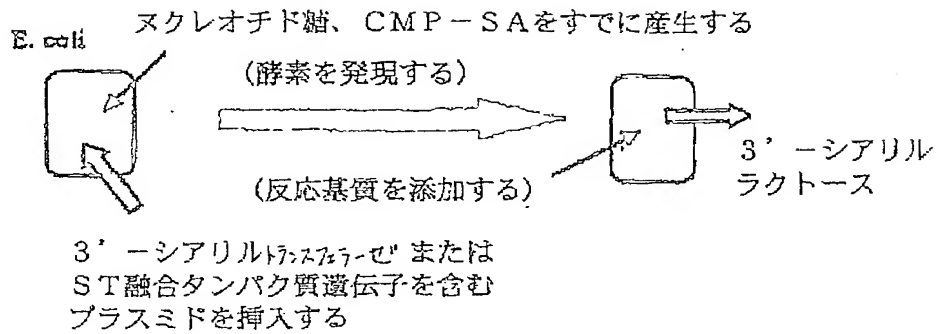
図15Aは、Gal α 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc-部分で終止する糖類の産物を産生するための細胞ベースの反応のスキームの例を示す。図15Aにおいて、UDP-ガラクトースを天然に存在する細胞は、 α 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする外因性遺伝子を発現するように改変される。アクセプター糖GlcNAc-Rの添加に際して、2つのガラクトシルトランスフェラーゼが、まず β 1, 4-連結ガラクトースを、次いで α 1, 3-連結終止ガラクトースを順々に加えるように働く。

【図15B】

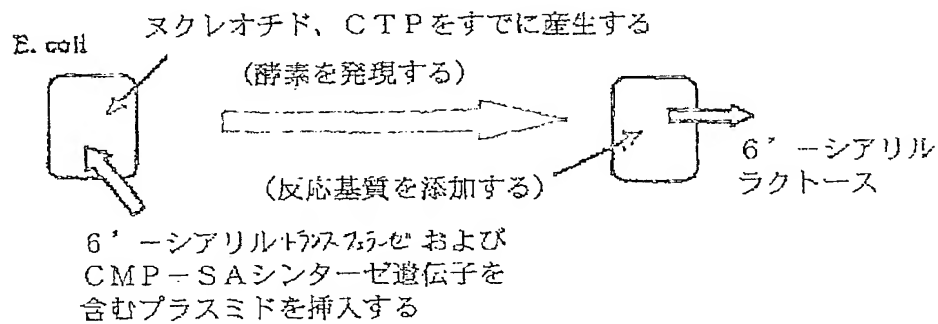
図15Bは、Gal α 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc-部分で終止する糖類の産物を産生するための細胞ベースの反応のスキームの例を示す。図15Bは、大規模合成に関して細胞型が十分なUTPを産生するが、十分なUDP-ガラクトースを産生しない場合の変形を示す。この状況を修正するために、UDP合成に含まれる酵素（例えば、UDP-Gal 4'-エピメラーゼおよびUDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ）をコードする遺伝子は、細胞内に導入される。これらの酵素は、反応物グルコース-1-リン酸からUDP-Galへの変換を触媒し、これは、2つのガラクトシルトランスフェラーゼのそれぞれに関する

糖ドナーとして順々に働く。さらに、2つのGal残基は、GlcNAc-Rア
クセプター糖類に連結される。

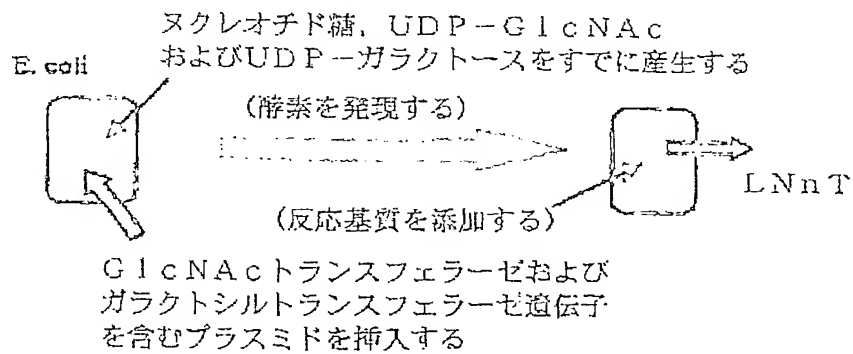
【図1A】



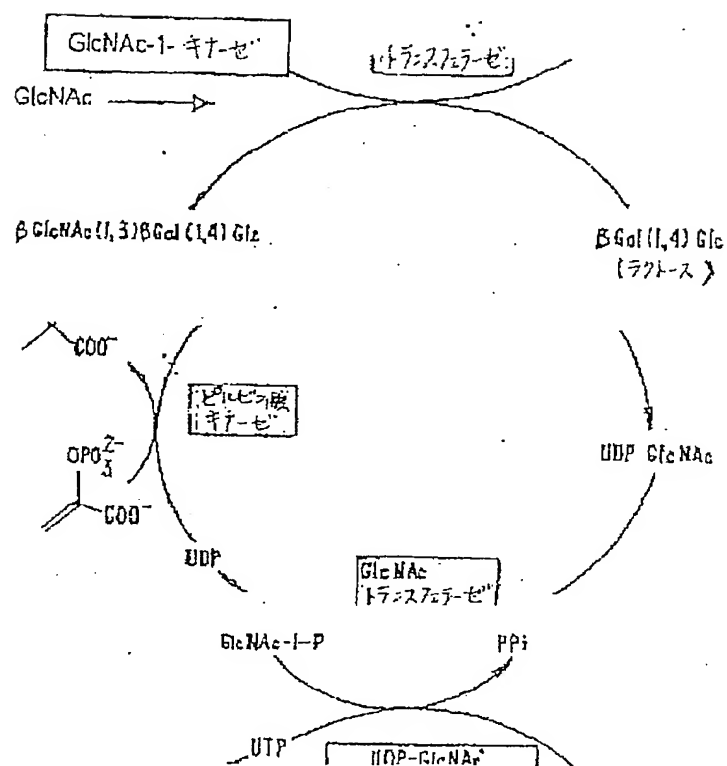
【図1B】



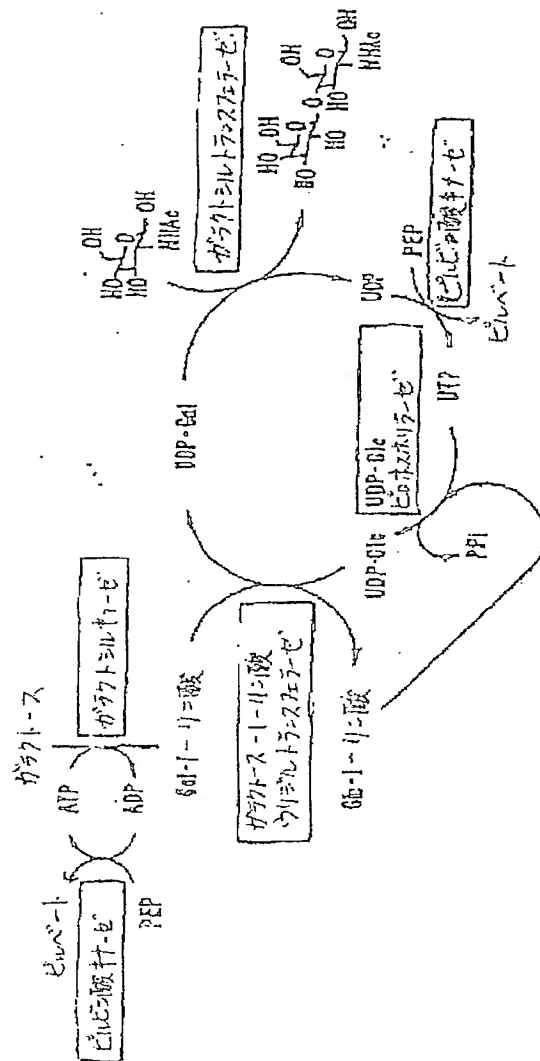
【図2】



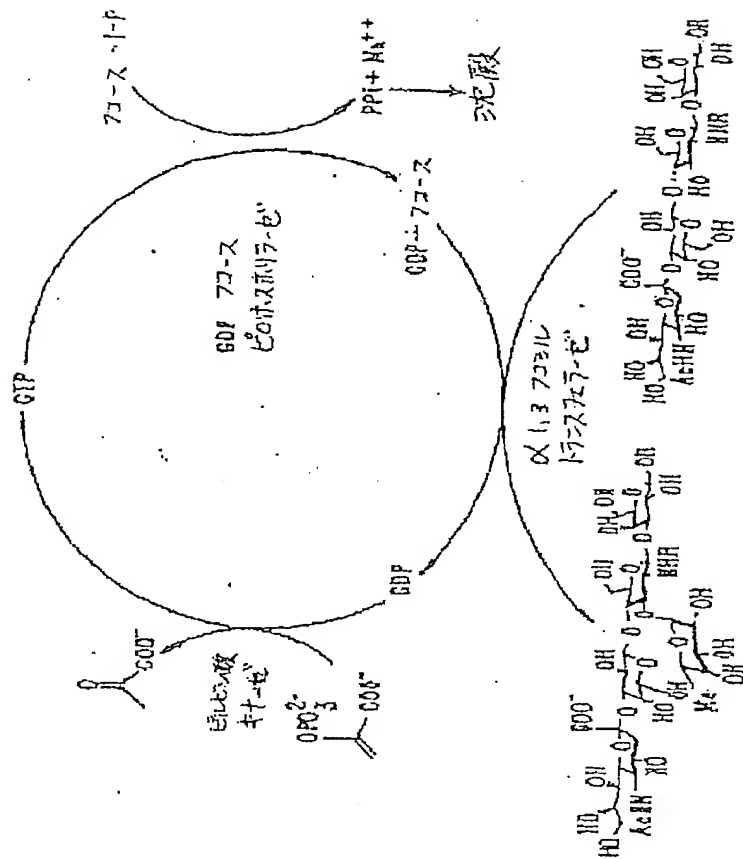
【図3】



【図4】



【図5】



UDP-GlcNAc
ピロホスホリラーゼ

UDP-GlcNAc 6-P
βGal(1,4)Glc
βGlcNAc(1,3)βGal(1,4)Glc

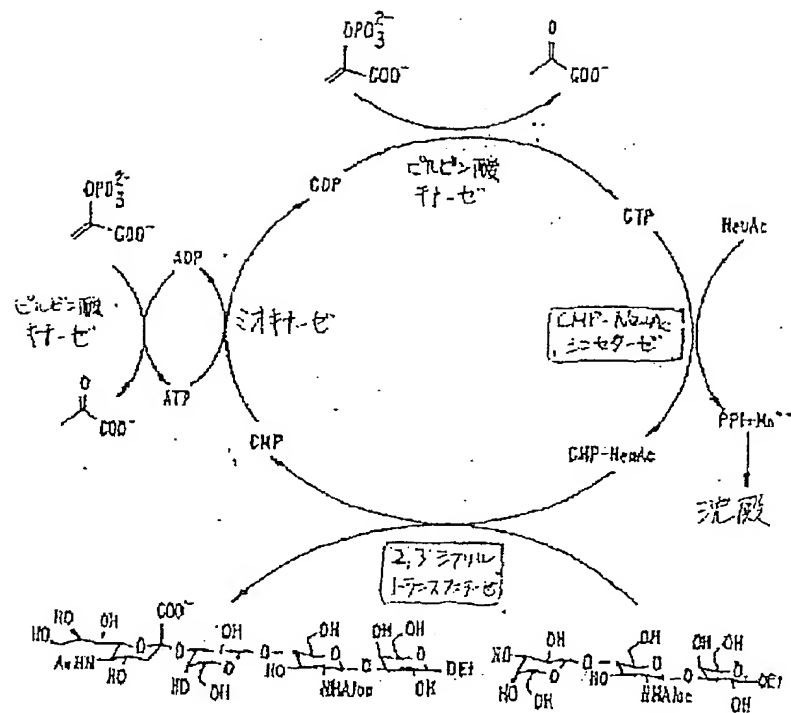
GlcNAc トランスフェラーゼ

UDP-GlcNAc 6-P
βGal(1,4)Glc
βGlcNAc(1,3)βGal(1,4)Glc

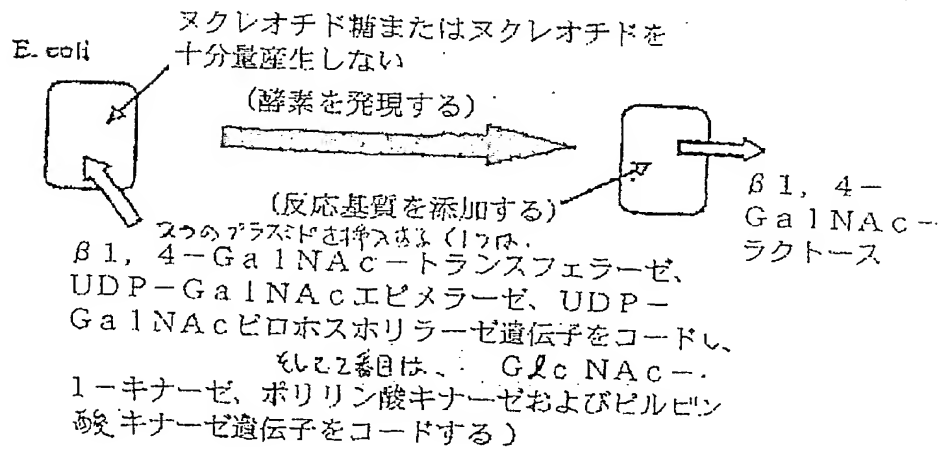
UDP-GlcNAc

βGlcNAc(1,3)βGal(1,4)Glc
βGal(1,4)Glc
(ラクトース)

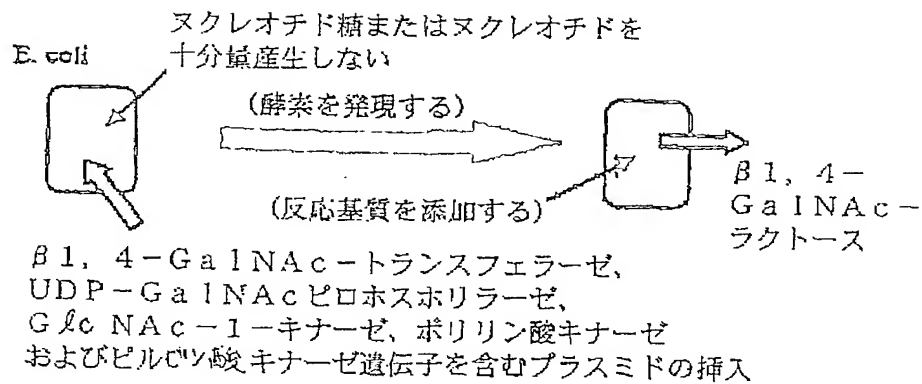
【図7】



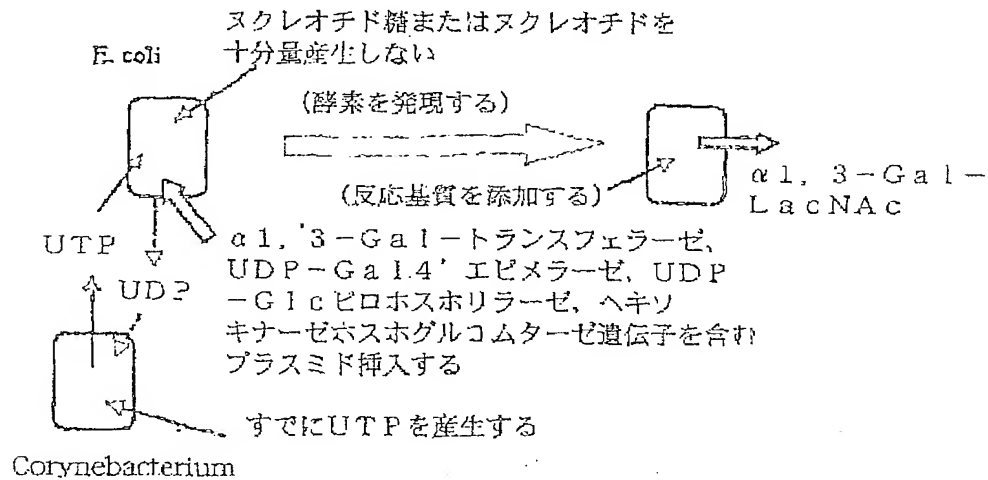
【図8A】



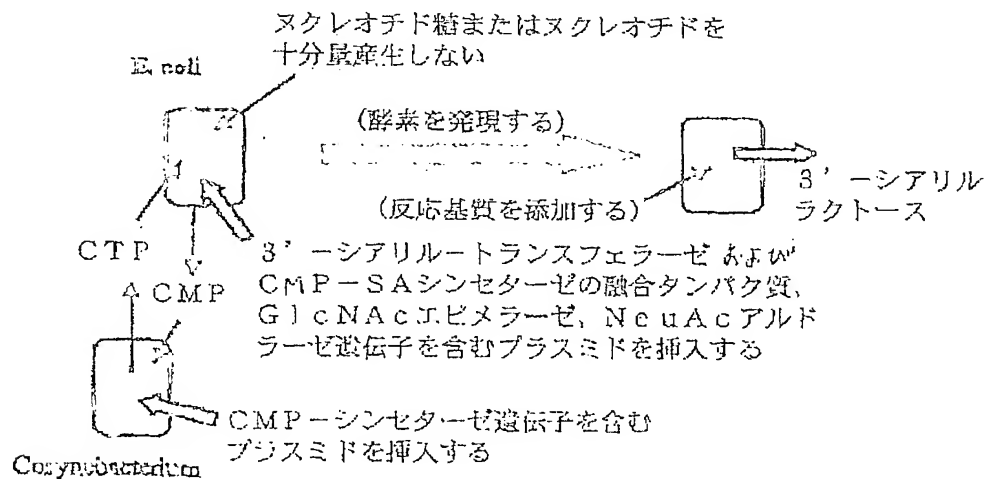
【図 8 B】



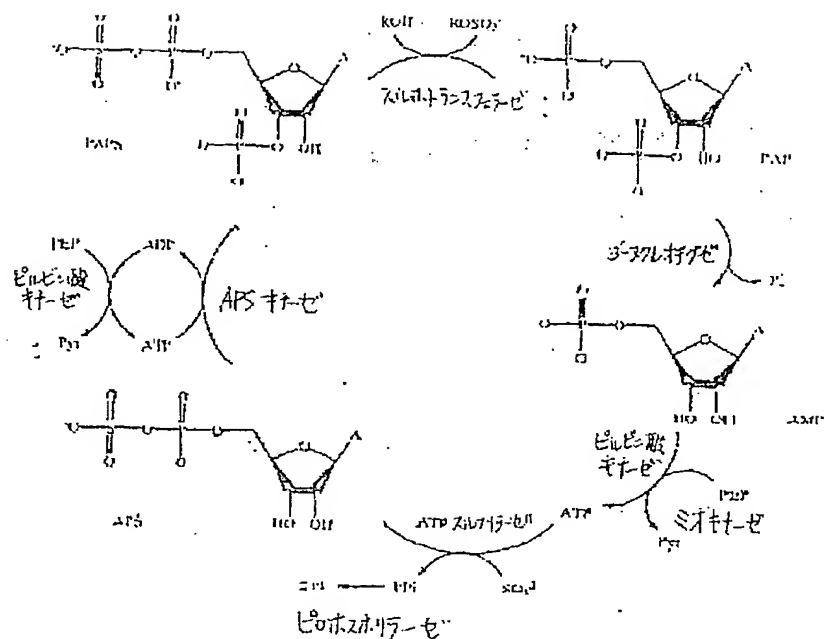
【図 9 A】



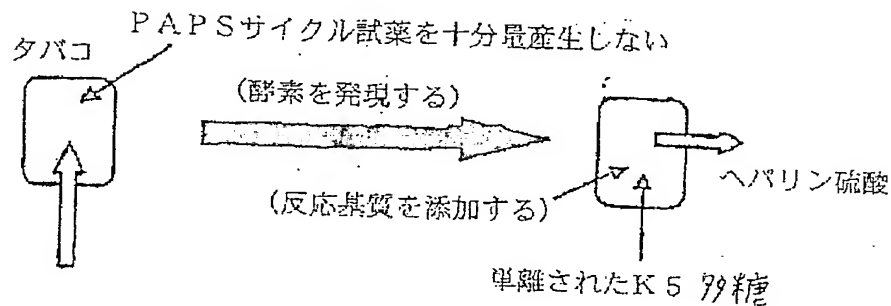
【図 9 B】



【図10】

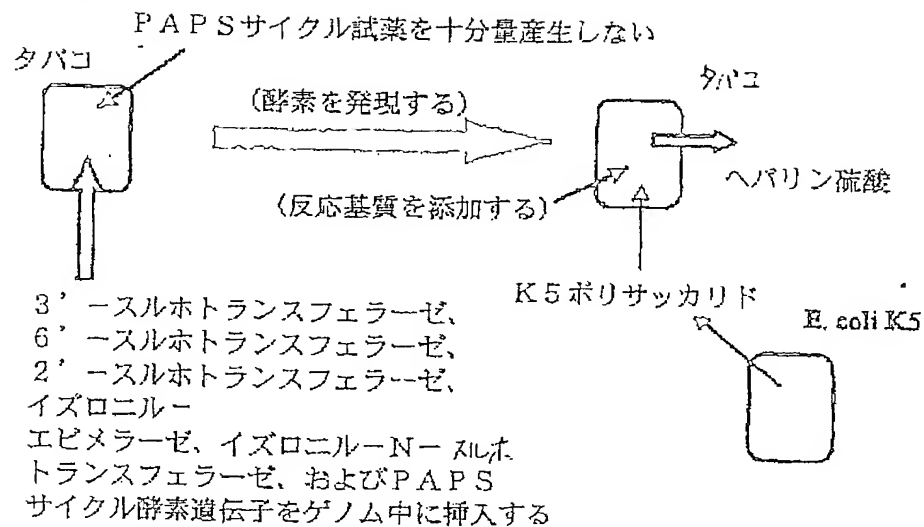


【図11A】

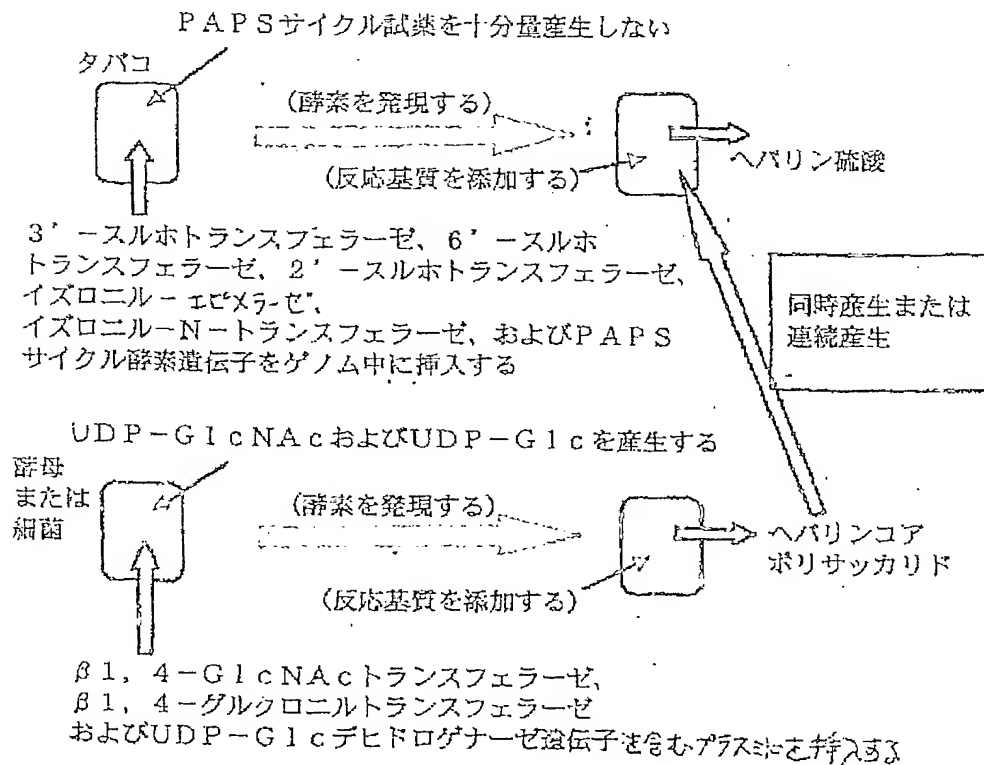


3'-スルホトランスフェラーゼ、6'-スルホトランスフェラーゼ、
2'-スルホトランスフェラーゼ、イゾロニル
エピメラーゼ、イゾロニル-N-スルホトランスフェラーゼ、およびPAPS
サイクル酵素遺伝子をゲノム中に挿入する

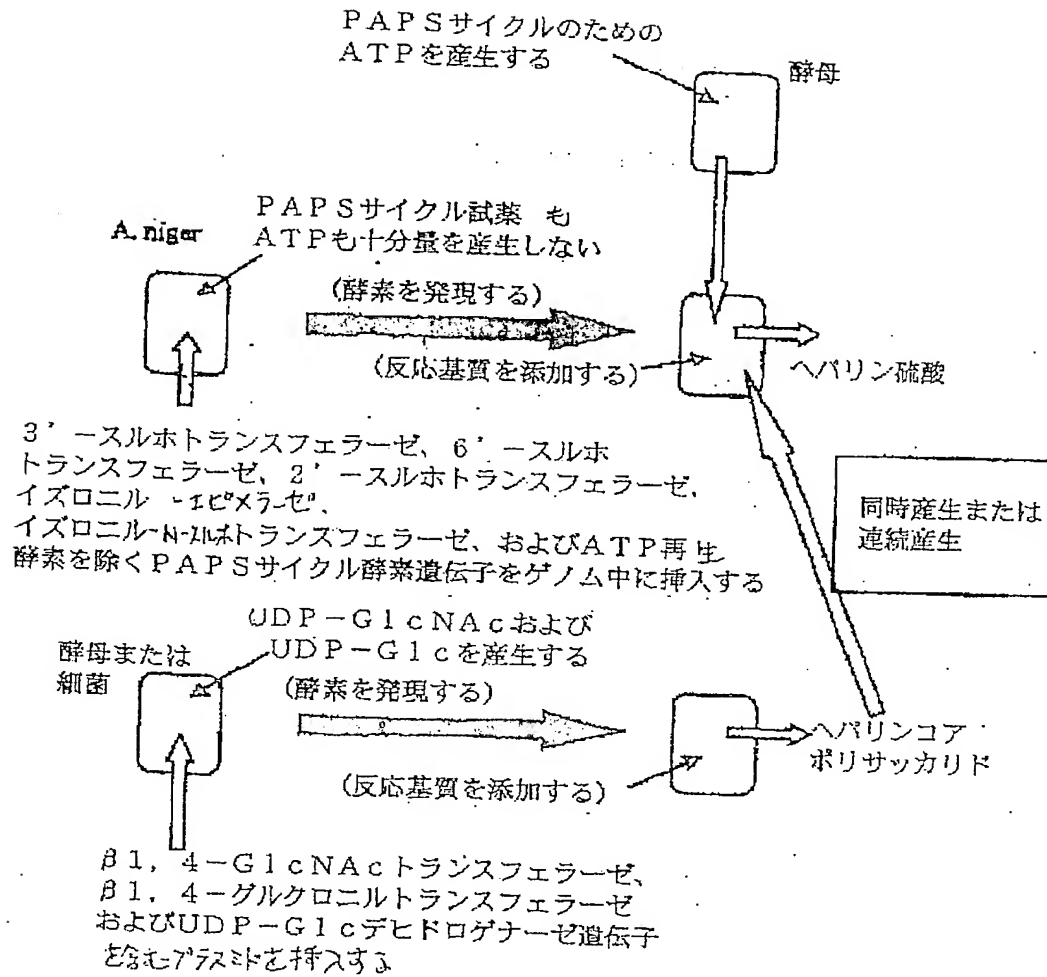
【図11B】



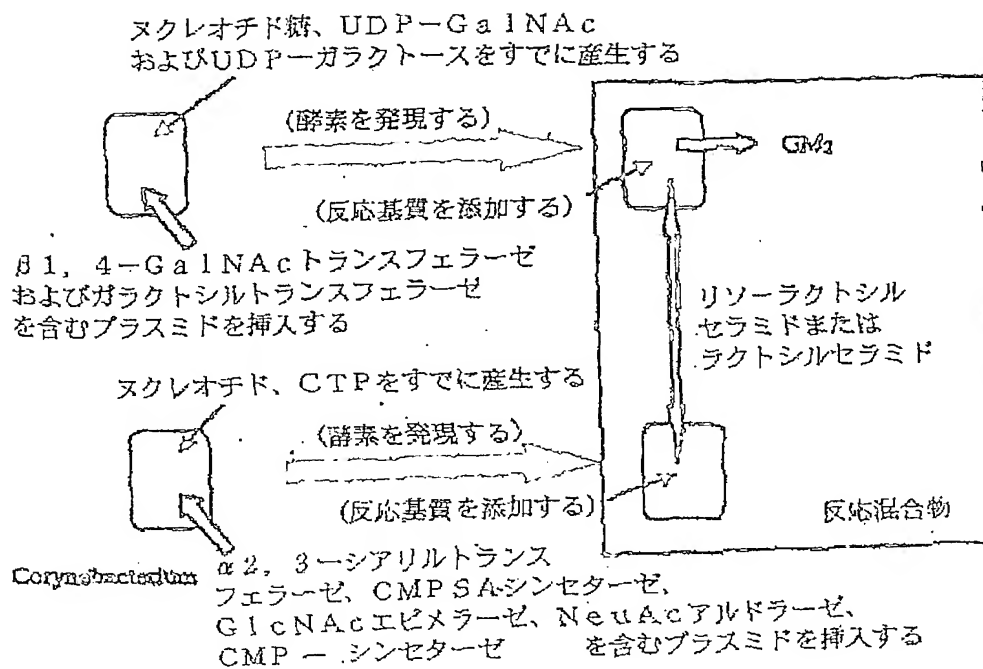
【図11C】



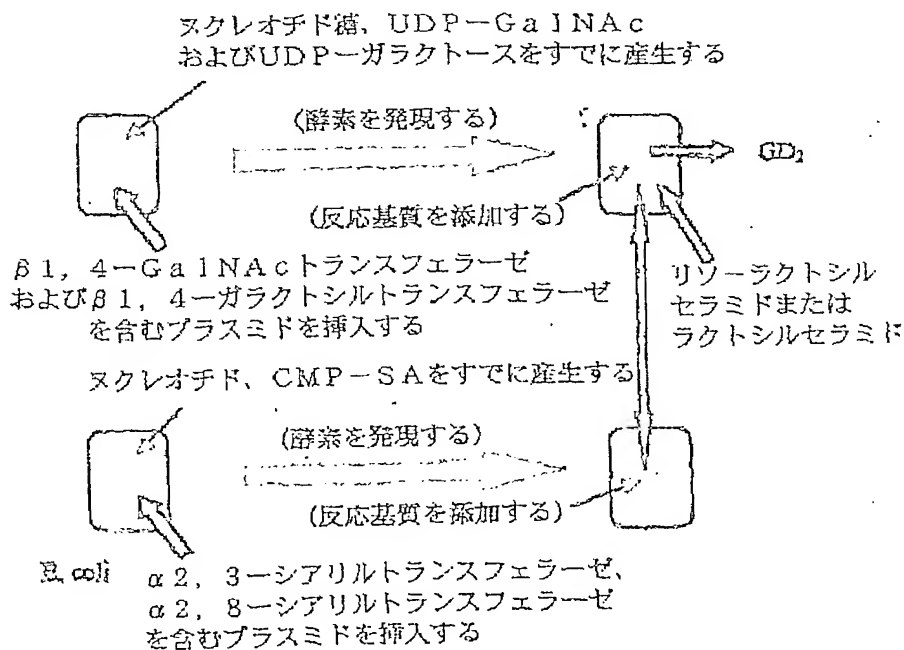
【図11D】



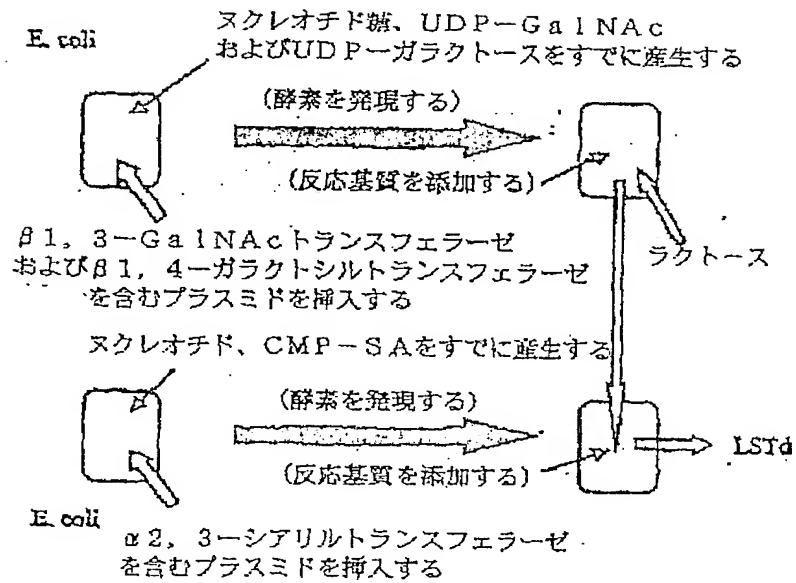
【図12】



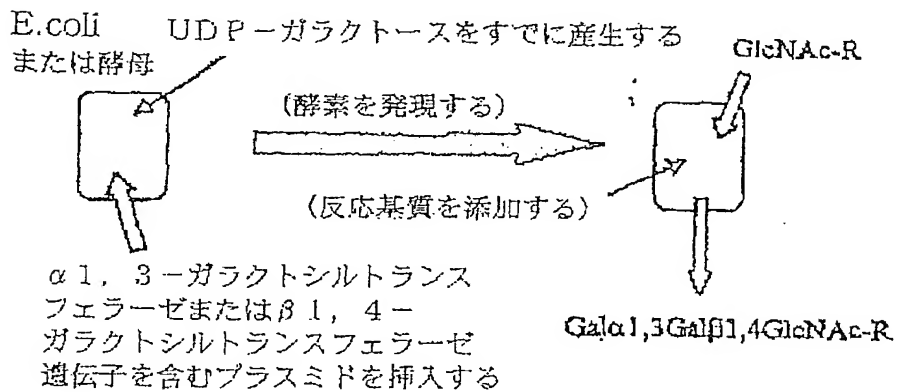
【図13】



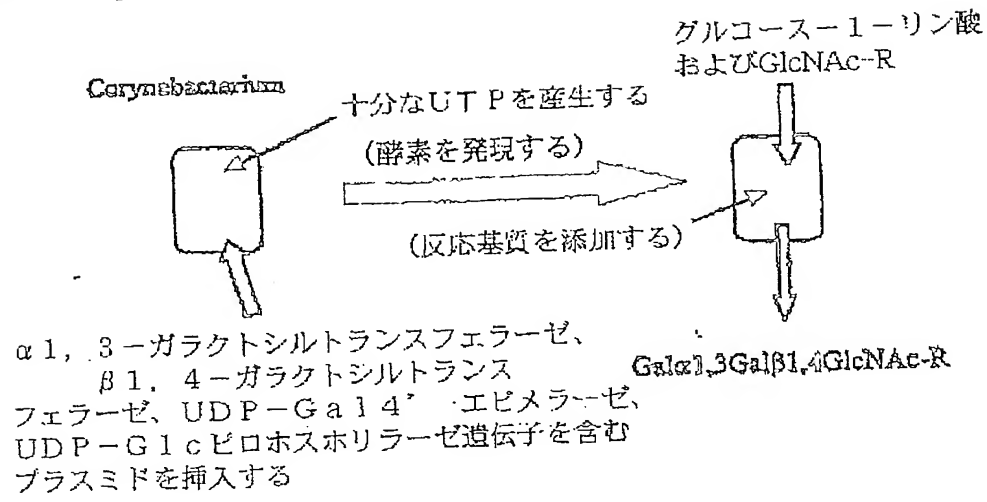
【図14】



【図15A】



【図15B】



【手続補正書】

【提出日】平成14年3月4日(2002.3.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖類の産物を産生するための反応混合物であって、ここで該反応混合物は、アクセプター糖類、および第1の型の植物細胞または微生物細胞を含み、該第1の型の植物細胞または微生物細胞は、以下：

a) ヌクレオチド糖、およびb) 該ヌクレオチド糖から該アクセプター糖類への糖の移行を触媒して、該糖類の産物を形成する第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、を産生する、反応混合物。

【請求項2】 前記細胞が、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、および植物細胞からなる群の1つ以上から選択される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項3】 前記細胞が、透過化処理されるか、さもなければ分裂される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項4】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、フコシルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、GDP-フコースである、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項5】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアル酸である、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項6】 前記ヌクレオチド糖が、UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-グルクロン酸、UDP-GalNAc、UDP-ガラクトロン酸、GDP-マンノースからなる群より選択される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項7】 前記第1の型の細胞が、野生型細胞と比較して上昇したレベ

ルで前記ヌクレオチド糖を産生する、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項8】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類中に該ヌクレオチド糖を取り込む該細胞の能力の欠損から生じる、請求項7に記載の反応混合物。

【請求項9】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記野生型細胞により産生されるヌクレオチド糖のレベルより、少なくとも10%高い、請求項7に記載の反応混合物。

【請求項10】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記野生型細胞により産生されるヌクレオチド糖のレベルより、少なくとも25%高い、請求項9に記載の反応混合物。

【請求項11】 前記ヌクレオチド糖が、異種遺伝子から発現される1つ以上の酵素を含む酵素経路により合成される、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項12】 前記組換えグリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアリ酸であり、そして前記異種遺伝子が、CMP-シアリ酸シンターゼをコードする、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項13】 前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、そして前記糖類の産物が、シアリルラクトースである、請求項12に記載の反応混合物。

【請求項14】 前記組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、UDP-GalNAcである、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項15】 前記アクセプターが、ラクトースであり、そして前記糖類の産物が、 β 1, 4-GalNAc-ラクトースである、請求項14に記載の反応混合物。

【請求項16】 前記組換えグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記ヌクレオチド糖が、UDP-Galである、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項17】 前記ガラクトシルトランスフェラーゼが、 α 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、末端 α 1, 3連

結ガラクトース残基を含む、請求項16に記載の反応混合物。

【請求項18】 前記酵素経路が、完全または一部の糖ヌクレオチド再生サイクルを含む、請求項11に記載の反応混合物。

【請求項19】 請求項18に記載の反応混合物であって、ここで前記ヌクレオチド糖が、UDP-GalNAcであり、そして前記糖ヌクレオチド再生サイクルが、以下：

UDP-GalNAc エピメラーゼ、UDP-GlcNAc ピロホスホリラーゼ、GlcNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、およびピルビン酸キナーゼ；ならびに

UDP-GalNAc ピロホスホリラーゼ、GlcNAc-1-キナーゼ、ポリリン酸キナーゼ、およびピルビン酸キナーゼ、

からなる群より選択される酵素の組を含む、反応混合物。

【請求項20】 前記反応混合物が、前記糖ヌクレオチドの産生のための基質として用いられるヌクレオチドを産生する第2の細胞型をさらに含む、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項21】 前記第2の細胞型が、前記ヌクレオチドの合成を触媒するヌクレオチドシンセターゼポリペプチドをコードする外因性遺伝子を含む、請求項20に記載の反応混合物。

【請求項22】 前記第1の細胞型が、以下：

a) 3'-シアリルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド、およびCMP-シアル酸シンセターゼ活性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質；ならびに

b) GlcNAcからのシアル酸の合成を触媒する酵素、
をコードする外因性遺伝子を含み；

そして前記第2の細胞型が、CMP-シンセターゼをコードする外因性遺伝子を含む、請求項21に記載の反応混合物。

【請求項23】 前記第1の細胞型が、E. coliであり、そして前記第2の細胞型が、酵母またはCorynebacteriumである、請求項21に記載の反応混合物。

【請求項24】 前記第1の型の細胞が、前記ヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒して、さらなるグリコシル化した糖類の産物を形成する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼを産生する、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項25】 前記ヌクレオチド糖が、UDP-Galであり、前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 α 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項24に記載の反応混合物。

【請求項26】 請求項25に記載の反応混合物であって、ここで前記アクセプター糖類が、 $\text{Glc(R)}\beta\text{-O-R}^1$ であり、ここで R^1 は、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COX}$ であり；Xは、OH、 OR^2 、 $-\text{NHNH}_2$ からなる群より選択され、RはOH、またはNAcであり； R^2 は、水素、糖類、オリゴ糖、または少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基、そしてnは、2~18の整数である、反応混合物。

【請求項27】 前記UDP-Galが、UDP-Gal4' エピメラーゼおよびUDP-Glcピロホスホリラーゼをコードする外因性遺伝子から発現される酵素により産生される、請求項25に記載の反応混合物。

【請求項28】 請求項1に記載の反応混合物であって、ここで前記細胞が、以下：

a) 少なくとも第2のヌクレオチド糖を産生するための酵素系、およびb) 該第2のヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒する少なくとも第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、をさらに含む、反応混合物。

【請求項29】 請求項28の反応混合物であって、ここで以下：
前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼがGlcNAcトランスフェラーゼであり、そして前記第1のヌクレオチド糖がUDP-GlcNAcであり；
そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2のヌクレオチド糖が、UDP-ガラクトー

スである、反応混合物。

【請求項30】 前記反応混合物が、ラクトーN-ネオテトラオース (L N n T) を形成する、請求項29に記載の反応混合物。

【請求項31】 前記反応混合物がまた、以下：

- a) 第2のスクレオチド糖、および
 - b) 該第2のスクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、
- を産生する、少なくとも第2の型の細胞を含む、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項32】 前記第1のグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2のグリコシルトランスフェラーゼが、GalNAcトランスフェラーゼである、請求項31に記載の反応混合物。

【請求項33】 請求項31の反応混合物であって、ここで以下：
前記第1の細胞型が、組換え β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼ、組換え β 1, 4-Galトランスフェラーゼ、UDP-GalNAc、およびUDP-Galを含み；そして前記第2の細胞型が、組換え α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼおよびCMP-シアル酸を含む、反応混合物。

【請求項34】 前記CMP-シアル酸が、組換え酵素CMP-シアル酸シンセターゼ、GlcNAcエピメラーゼ、NeuAcアルドラーゼ、およびCMP-シンセターゼを含む、前記第2の細胞型における酵素系により、CTPおよびGlcNAcから産生される、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項35】 前記アクセプター糖類が、ラクトシルセラミドまたはリノールラクトシルセラミドであり、そして糖類の産物がガングリオシドGM₂である、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項36】 前記第2の細胞型が、組換え α 2, 8-シアリルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項33に記載の反応混合物。

【請求項37】 前記アクセプターが、ラクトシルセラミド、またはリノールラクトシルセラミドであり、そして前記糖類の産物が、GD₂である、請求項36に記載の反応混合物。

【請求項38】 前記反応混合物がまた、前記第1の型の細胞により産生さ

れる、前記ヌクレオチド糖から合成されるヌクレオチドを産生する、第2の型の細胞を含む、請求項1に記載の反応混合物。

【請求項39】 請求項38に記載の反応混合物であって、ここで前記第2の細胞型により産生されるヌクレオチドおよび対応するヌクレオチド糖が、以下：

UTP：UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-グルクロン酸、またはUDP-ガラクトロン酸；

GTP：GDP-Fuc；および

CTP：CMP-シアル酸、

からなる群より選択される、反応混合物。

【請求項40】 糖類の産物を産生する細胞であって、ここで該細胞は、以下：

a) グリコシルトランスフェラーゼをコードする組換え遺伝子；

b) 該グリコシルトランスフェラーゼに対する基質であるヌクレオチド糖を形成するための酵素系；および

c) 外因性糖類アクセプター部分；

を含み、

ここで該グリコシルトランスフェラーゼは、該ヌクレオチド糖から該アクセプター部分への糖の移行を触媒して、該糖類の産物を産生する、細胞。

【請求項41】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、該ヌクレオチド糖を再生するためのサイクル酵素を含む、請求項40に記載の細胞。

【請求項42】 グリコシルトランスフェラーゼをコードする前記組換え遺伝子が、異種遺伝子である、請求項40に記載の細胞。

【請求項43】 前記細胞が、野生型細胞と比較して上昇したレベルで前記ヌクレオチド糖を形成する、請求項40に記載の細胞。

【請求項44】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類へと該ヌクレオチド糖を取り込む細胞の能力の欠損から生じる、請求項43に記載の細胞。

【請求項45】 前記欠損が、多糖類グリコシルトランスフェラーゼ活性の

減少したレベルによるものである、請求項44に記載の細胞。

【請求項46】 前記糖類の産物が、少なくとも約1mMの濃度で産生される、請求項40に記載の細胞。

【請求項47】 スクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、異種遺伝子によりコードされる酵素を含む、請求項40に記載の細胞。

【請求項48】 請求項47に記載の細胞であって、ここで前記異種遺伝子によりコードされる酵素が、以下：

GDP-マンノースデヒドラターゼ、GDP-マンノース3,5-エピメラーゼ、およびGDP-マンノース4-レダクターゼ；

UDP-ガラクトース4' エピメラーゼ；

UDP-GalNAc 4' エピメラーゼ；

CMP-シアル酸シンセターゼ；

UDP-Glcピロホスホリラーゼ、UDP-Galピロホスホリラーゼ、UDP-GalNAcピロホスホリラーゼ、GDP-マンノースピロホスホリラーゼ、およびUDP-GlcNAcピロホスホリラーゼ；からなる群より選択される、ピロホスホリラーゼ；

ミオキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、アセチルキナーゼ、クレアチンキナーゼからなる群より選択される、キナーゼ；

UDP-Glcデヒドロゲナーゼ、UDP-Galデヒドロゲナーゼ；およびピルビン酸デカルボキシラーゼ、

の1つ以上である、細胞。

【請求項49】 前記スクレオチド糖が、GDP-フコースである、請求項48に記載の細胞。

【請求項50】 硫酸化多糖類を産生する細胞であって、ここで該細胞は、スルホトランスフェラーゼをコードする異種遺伝子；およびPAPSを産生する酵素系を含む、細胞。

【請求項51】 前記硫酸化多糖類が、ヘパリン硫酸、およびカラゲニンからなる群より選択される、請求項50に記載の細胞。

【請求項52】 PAPSを産生する前記酵素系が、外因性遺伝子から発現

される1つ以上の酵素を含む、請求項50に記載の細胞。

【請求項53】 糖類の産物を産生する方法であって、ここで該方法は微生物細胞または植物細胞をアクセプター糖類と接触させる工程を包含し、ここで該細胞は、以下：

- a) ヌクレオチド糖を形成するための酵素系；および
- b) 該ヌクレオチド糖から該アクセプター糖類への糖の移行を触媒して、糖類の産物を産生する、組換えグリコシルトランスフェラーゼ、を含む、方法。

【請求項54】 前記グリコシルトランスフェラーゼが異種遺伝子によりコードされる、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記グリコシルトランスフェラーゼが、前記細胞に外因性である遺伝子によりコードされ、かつ野生型細胞と比較して上昇したレベルで前記細胞により産生される、請求項53に記載の方法。

【請求項56】 前記糖類の産物が、少なくとも約1mMの濃度で産生される、請求項53に記載の方法。

【請求項57】 前記細胞が、透過化処理される、請求項53に記載の方法。

【請求項58】 前記細胞が、インタクトな細胞である、請求項53に記載の方法。

【請求項59】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系が、異種遺伝子によりコードされる酵素を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項60】 請求項59に記載の方法であって、ここで前記異種遺伝子によりコードされる酵素が、以下：

GDP-マンノースデヒドラターゼ、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース3, 5-エピメラーゼ、およびGDP-4-ケト-6-デオキシ-L-グルコース4-レダクターゼ；

UDP-ガラクトース4' エピメラーゼ；

UDP-GalNAc 4' エピメラーゼ；

CMP-シアル酸シンセターゼ；

UDP-Glc ピロホスホリラーゼ、UDP-Gal ピロホスホリラーゼ、UDP-GalNAc ピロホスホリラーゼ、GDP-マンノースピロホスホリラーゼ、およびUDP-GlcNAc ピロホスホリラーゼからなる群より選択される、ピロホスホリラーゼ；ミコキナーゼ、ビルビン酸キナーゼ、アセチルキナーゼ、クレアチンキナーゼからなる群より選択される、キナーゼ；

UDP-Glc デヒドロゲナーゼ、UDP-Gal デヒドロゲナーゼ；ならびにビルビン酸デカルボキシラーゼ、
の1つ以上である、方法。

【請求項61】 ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素、およびグリコシルトランスフェラーゼが、融合タンパク質として発現される、請求項59に記載の方法。

【請求項62】 前記融合タンパク質が、CMP-シアル酸シンセターゼ活性、およびシアリルトランスフェラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】 前記融合タンパク質が、ガラクトシルトランスフェラーゼ活性、およびUDP-Gal 4' エピメラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項64】 前記融合タンパク質が、GalNAc トランスフェラーゼ活性、およびUDP-GlcNAc 4' エピメラーゼ活性を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項65】 前記ヌクレオチド糖が、GDP-フコースであり、そして前記グリコシルトランスフェラーゼが、フコシルトランスフェラーゼである、請求項53に記載の方法。

【請求項66】 前記細胞が、野生型細胞と比較して上昇したレベルで、ヌクレオチド糖を形成する、請求項53に記載の方法。

【請求項67】 前記ヌクレオチド糖の上昇したレベルが、前記細胞により通常産生される多糖類中へ該ヌクレオチド糖を取り込む該細胞の能力の欠損から生じる、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記欠損が、多糖類グリコシルトランスフェラーゼ活性の減少したレベルによるものである、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 請求項53に記載される方法であって、ここで前記細胞／ヌクレオチド糖が、以下：

Azotobacter vinelandii／GDP-Man；

*Pseudomonas*種／UDP-Glc、およびGDP-Man；

*Rhizobium*種／UDP-Glc、UDP-Gal、GDP-Man；

*Erwinia*種／UDP-Gal、UDP-Glc；

*Escherichia*種／UDP-GlcNAc、UDP-Gal、CMP-NeuAc、GDP-Fuc；

*Klebsiella*種／UDP-Gal、UDP-GlcNAc、UDP-Glc、UDP-GlcNAc；

Hansenula jadinii／GDP-Man、GDP-Fuc；

Candida famata／UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcNAc；

Saccharomyces cerevisiae／UDP-Glc、UDP-Gal、GDP-Man、GDP-GlcNAc；および

X. campestris／UDP-Glc、GDP-Man、

からなる群より選択される、方法。

【請求項70】 前記細胞が、*Azotobacter Vinelandii*であり、前記ヌクレオチド糖が、GDP-マンノースであり、前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、前記グリコシルトランスフェラーゼが、マンノシルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、マンノシルラクトースである、請求項53に記載の方法。

【請求項71】 前記細胞が、*E. coli*であり、前記ヌクレオチド糖が、CMP-シアル酸であり、前記アクセプター糖類が、ラクトースであり、前記グリコシルトランスフェラーゼが、シアリルトランスフェラーゼであり、そして前記糖類の産物が、シアリルラクトースである、請求項53に記載の方法。

【請求項72】 ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連する化合物についての多糖類骨格を合成するための方法であって、ここで該方法は、末端グルクロン酸またはGlcNAc残基を含むアクセプター糖類と、反応混合物とを接合させ

る工程であって、ここで該反応混合物は、以下：

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

- a) UDP-GlcNAcを形成するための酵素系；および
- b) 該UDP-GlcNAcから該アクセプター糖類上の末端グルクロン酸へのGlcNAcの移行を触媒して、末端GlcNAc残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；ならびに

以下を含む微生物細胞または植物細胞：

- a) UDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；および
- b) 該UDP-グルクロン酸から該アクセプター糖類上の末端GlcNAc残基へのグルクロン酸の移行を触媒して、末端グルクロン酸残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ；

を含む、工程、ならびに

該反応を、該多糖類骨格が合成されるまで続けさせる工程、

を包含する、方法。

【請求項73】 請求項72に記載の方法であって、ここで前記反応混合物が、以下：

- a) UDP-GlcNAcおよびUDP-グルクロン酸を形成するための酵素系；
- b) 組換えGlcNAcトランスフェラーゼ；および
- c) 組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ、

を含む単一の細胞型を含む、方法。

【請求項74】 請求項72に記載の方法であって、ここで前記UDP-GlcNAcおよび組換えGlcNAcトランスフェラーゼを形成するための前記酵素系が、第1の細胞型にあり、そして前記UDP-グルクロン酸および組換えグルクロン酸トランスフェラーゼを形成するための前記酵素系が、第2の細胞型にある、方法。

【請求項75】 UDP-GlcNAcおよびUDP-グルクロン酸を産生するためのいずれかまたは両方の前記酵素系が、完全なまたは一部の糖ヌクレオチド再生サイクルを含む、請求項72に記載の方法。

【請求項76】 ヘパリン、ヘパラン硫酸、および関連する化合物を合成するための方法であって、ここで該方法は、ヘパラン多糖類骨格と、微生物細胞または植物細胞を含む反応混合物とを接触させる工程を包含し、該微生物細胞または植物細胞は、以下：

- a) PAPSを形成するための酵素系；および
- b) 該PAPSから該ヘパラン多糖類骨格への硫酸を移行を触媒して、N-硫酸化多糖類を産生する、組換えスルホトランスフェラーゼ、を含む、方法。

【請求項77】 PAPSを形成するための前記酵素系が、PAPSサイクルを包含する、請求項76に記載の方法。

【請求項78】 請求項76に記載の方法であって、ここで該方法が、前記N-硫酸化多糖類と、グルクロン酸5'-エピメラーゼとを接触させて、前記多糖類骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基をイズロン酸へと転換する工程をさらに包含する、方法。

【請求項79】 前記グルクロン酸5'-エピメラーゼが、該グルクロン酸5'-エピメラーゼをコードする遺伝子を含む前記反応混合物に存在する細胞により発現される、請求項78に記載の方法。

【請求項80】 請求項78に記載の方法であって、ここで該方法は、前記イズロン酸含有N-硫酸化多糖類と、1つ以上のO-スルホトランスフェラーゼとを接触させて、ヘパラン硫酸を形成する工程をさらに包含する、方法。

【請求項81】 請求項80に記載の方法であって、ここで前記O-スルホトランスフェラーゼが、該O-スルホトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む、前記反応混合物中に存在する細胞により発現される、方法。

【請求項82】 前記O-スルホトランスフェラーゼを発現する前記細胞が、PAPSを形成するための酵素系をさらに含む、請求項81に記載の方法。

【請求項83】 請求項76に記載の方法であって、ここで前記ヘパリン多糖類骨格が、以下：
末端グルクロン酸またはGlcNAc残基を含むアクセプター糖類と、反応混合物とを接触させる工程であって、ここで該反応混合物は、以下：

1) 以下を含む微生物細胞または植物細胞:

- a) UDP-GlcNAcを形成するための酵素系; および
- b) 該UDP-GlcNAcから該アクセプター糖類上の末端グルクロン酸へのGlcNAcの移行を触媒して、末端GlcNAc残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えGlcNAcトランスフェラーゼ; ならびに

2) 以下を含む微生物細胞または植物細胞:

- a) UDP-グルクロン酸を形成するための酵素系; および
 - b) 該UDP-グルクロン酸から該アクセプター糖類上の末端GlcNAc残基へのグルクロン酸の移行を触媒して、末端グルクロン酸残基を含むアクセプター糖類を産生する、組換えグルクロン酸トランスフェラーゼ;
- を含む、工程、ならびに
該反応を、該多糖類骨格が合成されるまで続けさせる工程、
を包含する、方法によって得られる、方法。

【請求項84】 請求項72に記載の方法であって、ここで該方法が、ヘパラン多糖類骨格を塩基で処理し、そして該ヘパラン多糖類骨格を化学的に硫酸化して、N-硫酸化ヘパラン多糖類骨格を形成する、工程をさらに包含する、方法。

【請求項85】 請求項84に記載の方法であって、ここで該方法は、前記N-硫酸化多糖類と、グルクロン酸5'-エピメラーゼとを接触させて、前記多糖類骨格中の1つ以上のグルクロン酸残基を、イズロン酸へと転換する工程をさらに包含する、方法。

【請求項86】 請求項85に記載の方法であって、ここで該方法は、前記イズロン酸含有N-硫酸化多糖類を、1つ以上のO-スルホトランスフェラーゼと接触させて、ヘパリン硫酸を形成する工程をさらに包含する、方法。

【請求項87】 請求項53に記載の方法であって、ここで該方法は、前記微生物細胞または植物細胞を、前記ヌクレオチド糖を形成するための前記酵素系についての基質として用いられるヌクレオチドを産生する第2の細胞型と接触させる工程をさらに包含する、方法。

【請求項88】 請求項87に記載の方法であって、ここで、前記第2の細

胞型が、前記ヌクレオチドの合成を触媒するヌクレオチドシンセターゼポリペプチドをコードする外因性遺伝子を含む、方法。

【請求項89】 請求項88に記載の方法であって、ここで、前記微生物細胞または植物細胞が、以下：

a) 3'-シアリルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド、およびCMP-シアル酸シンセターゼ活性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質；ならびに

b) GlcNAcからのシアル酸の合成を触媒する酵素、をコードする外因性遺伝子を含む；

そして前記第2の細胞型が、CMP-シンセターゼをコードする外因性遺伝子を含む、方法。

【請求項90】 前記微生物細胞または植物細胞が、*E. coli*であり、そして前記第2の細胞型が、酵母または*Corynebacterium*である、請求項88に記載の方法。

【請求項91】 前記微生物細胞または植物細胞が、前記ヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒して、さらなるグリコシル化した糖類の産物を形成する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼを産生する、請求項87に記載の方法。

【請求項92】 前記ヌクレオチド糖が、UDP-Galであり、前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、 α 1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項91に記載の方法。

【請求項93】 請求項92に記載の方法であって、ここで前記アクセプター糖類が、 $\text{Glc}(\text{R})\beta\text{-O-R}^1$ であり、ここで R^1 は、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-COX}$ であり；Xは、OH、 OR^2 、 $-\text{NHNH}_2$ からなる群より選択され、RはOH、またはNAcであり； R^2 は、水素、糖類、オリゴ糖、または少なくとも1つの炭素原子を有するアグリコン基、そしてnは、2～18の整数である、方法。

【請求項94】 前記UDP-Galが、UDP-Gal4'エピメラーゼおよびUDP-Glcピロホスホリラーゼをコードする外因性遺伝子から発現さ

れる酵素により産生される、請求項92に記載の方法。

【請求項95】 請求項53に記載の方法であって、ここで前記微生物細胞または植物細胞が、以下：

a) 少なくとも第2のヌクレオチド糖を産生するための酵素系、およびb) 該第2のヌクレオチド糖から前記糖類の産物への糖の移行を触媒する少なくとも第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、

をさらに包含する、方法。

【請求項96】 請求項95に記載の方法であって、ここで以下：

前記第1の組換えグリコシルトランスフェラーゼがGlcNAcトランスフェラーゼであり、そして前記第1のヌクレオチド糖がUDP-GlcNAcであり；そして前記第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼが、ガラクトシルトランスフェラーゼであり、そして前記第2のヌクレオチド糖が、UDP-ガラクトースである、方法。

【請求項97】 前記方法が、ラクトーN-ネオテトラオース(LNnT)を形成する、請求項96に記載の方法。

【請求項98】 請求項53に記載の方法であって、ここで、該方法は、前記糖類の産物を、以下：

a) 第2のヌクレオチド糖、および

b) 該第2のヌクレオチド糖から前記糖類の産物への該糖の移行を触媒する、第2の組換えグリコシルトランスフェラーゼ、

を産生する、少なくとも第2の型の細胞と接触させる工程をさらに包含する、方法。

【請求項99】 前記第2の型の細胞が、植物細胞または微生物細胞である、請求項98に記載の方法。

【請求項100】 1つの細胞型が、ガラクトシルトランスフェラーゼを含み、そして別の細胞型が、GalNAcトランスフェラーゼを含む、請求項98に記載の方法。

【請求項101】 請求項98に記載の方法であって、ここで以下：

1つの細胞型が、組換え β 1, 4-GalNAcトランスフェラーゼ、組換え β

1, 4-Galトランスフェラーゼ、UDP-GalNAc、およびUDP-Galを含み；そして別の細胞型が、組換え α 2, 3-シアリルトランスフェラーゼおよびCMP-シアル酸を含む、方法。

【請求項102】 前記CMP-シアル酸が、組換え酵素CMP-シアル酸シンセターゼ、GlcNAcエピメラーゼ、NeuAcアルドラーゼ、およびCMP-シンセターゼを含む、酵素系により、CTPおよびGlcNAcから產生される、請求項101に記載の方法。

【請求項103】 前記アクセプター糖類が、ラクトシルセラミドまたはリソラクトシルセラミドであり、そして前記糖類の産物がガングリオシドGM₂である、請求項101に記載の方法。

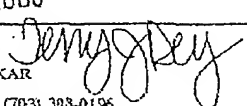
【請求項104】 1つの細胞型が、組換え α 2, 8-シアリルトランスフェラーゼをさらに含む、請求項101に記載の方法。

【請求項105】 前記アクセプターが、ラクトシルセラミド、またはリソラクトシルセラミドであり、そして前記糖類の産物が、GD₂である、請求項104に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/27599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/10, 1/20, 15/00; C07H 21/04 US CL : 435/193, 252.3, 254.11, 320.1, 325, 6, 172.3 : 536/23.2, 24.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/193, 252.3, 254.11, 320.1, 325, 6, 172.3 : 536/23.2, 24.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,705,367 A (GOTSCHLICH) 06 January 1998 (06/01/98), see entire document.	53-60
Y	US 5,798,233 A (GOTSCHLICH) 25 August 1998 (25/08/98), see entire document.	1-39 and 53-71
Y	US 5,541,083 A (PAULSON et al) 30 July 1996 (30/06/96), see entire document.	1-39 and 53-71
A,P	US 5,922,577 A (DEFREES et al) 13 July 1999 (13/07/99), see entire document.	53-71
X	KOIZUMI et al. Large scale production of UDP-galactose and globotriase by coupling metabolically engineered bacteria: Nature Biotechnology. September 1998, Vol. 16, No. 9, pages 847-850, see entire document.	1-39 and 53-71
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
07 JUNE 2000		04. AUG 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer 
Facsimile No. (703) 305-3230		PADMA BASKAR Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/27599

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-39 and 53-71
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US99/27599

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

STN, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, LIPESCI, SCISEARCH, CONFSCI, EMBASE, WPIDS, NCST-EPLUS, BIOBUSINESS, BIOTECHDS, USPATFUL.

search terms: saccharid, glycosyl, oligosaccharide, polysaccharide, glycosyl transferase, sialyl transferase, biosynthesis, sugar, nucleotide, udp gal 4 epimerase, recombinant, udp glc pyrophosphorylase, glc transferase, udp glnac.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-39 drawn to reaction mixture for producing a product saccharide.

Group II, claim(s) 40-52, drawn to a cell that produces a product saccharide.

Group III, claim(s) 53-71, drawn to a method of producing a product saccharide.

Group IV, claim(s) 72-86, drawn to a method for synthesizing a polysaccharide.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I is directed to a reaction mixture comprises an acceptor saccharide and recombinant glycosyltransferase which is the first product. The special technical feature is the reaction mixture comprises saccharide and recombinant glycosyltransferase. Groups II is drawn to structurally different product, a cell that produces product saccharide. Group I and II are drawn to structurally different products which do not require each other for their practice and do not share the same or a corresponding technical feature. The Groups III and IV inventions are drawn to methods having different goals, method steps and starting materials, which do not require each other for their practice and do not share the same or a corresponding technical feature. Note that PCT Rule 13 does not provide for multiple products or methods within a single application. Since the special technical feature of the Group I invention is not present in the Group II-IV claims, and the special technical features of the Group II-IV inventions are not present in the Group I claims, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

ターム (参考)

C 12 N 9/10

C 12 N 15/00

A

C 12 P 19/28

5/00

C

(51)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ジョンソン, カール

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19090.

ウィロー グローブ, ウィンザー ア

ベニュー, 2941

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA03 CA04 DA01

DA05 DA11 EA04 GA11

4B050 CC03 DD01 DD13 LL05

4B064 AF21 CA19 CC24 DA10 DA16

4B065 AA01X AA01Y AA72X AA72Y

AA88X AA88Y AB01 AC14

BA02 CA16

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] It is a reaction mixture for producing the product of a saccharide, this reaction mixture contains the plant cell or microbial cell of an acceptor saccharide and the 1st mold here, and the plant cell or microbial cell of this 1st mold is the following. : a Nucleotidyl sugar and b Reaction mixture which carries out the catalyst of the shift of sugar to this acceptor saccharide from this nucleotidyl sugar, and produces the 1st recombination glucosyltransferase which forms the product of this saccharide.

[Claim 2] The reaction mixture according to claim 1 chosen or more from one of the groups which said cell becomes from a bacterial cell, a yeast cell, a fungus cell, and a plant cell.

[Claim 3] The reaction mixture according to claim 1 with which said cell is transparency--ization-processed or is divided.

[Claim 4] The reaction mixture according to claim 1 said whose glycosyltransferase is fucosyltransferase and said whose nucleotidyl sugar is GDP-fucose.

[Claim 5] The reaction mixture according to claim 1 said whose glycosyltransferase is a sialyltransferase and said whose nucleotidyl sugar is a CMP-sialic acid.

[Claim 6] The reaction mixture according to claim 1 chosen from the group which said nucleotidyl sugar becomes from UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-glucuronic acid, UDP-GalNAc, an UDP-galacturonic acid, and GDP mannose.

[Claim 7] The reaction mixture according to claim 1 which produces said nucleotidyl sugar on the level on which said 1st type of cell went up as compared with the wild type cell.

[Claim 8] The reaction mixture according to claim 7 which the level on which said nucleotidyl sugar went up produces from the deficit of the capacity of this cell to incorporate this nucleotidyl sugar in the polysaccharide usually produced by said cell.

[Claim 9] A reaction mixture according to claim 7 with the level higher at least 10% than the level of the nucleotidyl sugar produced by said wild type cell on which said nucleotidyl sugar went up.

[Claim 10] A reaction mixture according to claim 9 with the level higher at least 25% than the level of the nucleotidyl sugar produced by said wild type cell on which said nucleotidyl sugar went up.

[Claim 11] The reaction mixture according to claim 1 compounded by the enzyme path in which said nucleotidyl sugar contains one or more enzymes discovered from a heterologous gene.

[Claim 12] The reaction mixture according to claim 11 with which said recombination glycosyltransferase is a sialyltransferase, and said nucleotidyl sugar is a CMP-sialic acid, and said heterologous gene carries out the code of the CMP-sialic-acid synthase.

[Claim 13] The reaction mixture according to claim 12 said whose acceptor saccharide is a lactose and whose product of said saccharide is a sialyl lactose.

[Claim 14] The reaction mixture according to claim 11 said whose recombination glucosyltransferases are beta 1 and a 4-GalNAc transferase and said whose nucleotidyl sugar is UDP-GalNAc.

[Claim 15] The reaction mixture according to claim 14 said whose acceptor is a lactose and whose products of said saccharide are beta 1 and a 4-GalNAc-lactose.

[Claim 16] The reaction mixture according to claim 11 said whose recombination glucosyltransferase is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

a GURUKO tosyl transferase and said whose nucleotidyl sugar is UDP-Gal.

[Claim 17] The reaction mixture according to claim 16 with which said glucosyltransferases are alpha 1 and 3-GURUKO tosyl transferase, and the product of said saccharide contains an end alpha 1 and 3 connection galactose residue.

[Claim 18] That said enzyme path is perfect or the reaction mixture containing some sugar nucleotide regenerative cycles according to claim 11.

[Claim 19] a reaction mixture according to claim 18 -- it is -- here -- said nucleotidyl sugar -- UDP-GalNAc -- it is -- and said sugar nucleotide regenerative cycle -- following:UDP-GalNAc epimerase, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, GlcNAc-1-kinase, polyphosphoric acid kinase, and pyruvate kinase; and UDP-GalNAc pyrophosphorylase, a GlcNAc-1-kinase, a polyphosphoric acid kinase, and a pyruvate kinase -- since -- the reaction mixture containing the enzyme of the set chosen from the becoming group.

[Claim 20] The reaction mixture according to claim 19 which contains further the 2nd cell type with which said reaction mixture produces the nucleotide used as a substrate to said sugar nucleotide regenerative cycle.

[Claim 21] The reaction mixture containing the exogenous gene to which said 2nd cell type carries out the code of the nucleotide synthetase polypeptide which carries out the catalyst of the composition of said nucleotide according to claim 20.

[Claim 22] Said 1st cell type contains the exogenous gene which carries out the code of the enzyme which carries out the catalyst of the composition of the sialic acid from fusion protein; containing the polypeptide which has :a3'-sialyltransferase activity below, and the polypeptide which has CMP-sialic-acid synthetase activity, and bGlcNAc.;

And the reaction mixture according to claim 21 with which said 2nd cell type contains the exogenous gene which carries out the code of the CMP-synthetase.

[Claim 23] The reaction mixture according to claim 21 said whose 1st cell type is E.coli and this whose 2nd cell type is yeast or Corynebacterium.

[Claim 24] The reaction mixture according to claim 1 which produces the 2nd recombination glycosyltransferase in which said 1st type of cell carries out the catalyst of the shift of sugar to the product of said saccharide from said nucleotidyl sugar, and forms the product of the glycosylated further saccharide.

[Claim 25] The reaction mixture according to claim 24 said whose 2nd recombination glycosyltransferase said nucleotidyl sugar is UDP-Gal, and said 1st recombination glycosyltransferase is beta 1 and 4-galactosyltransferase, and is alpha 1 and 3-galactosyltransferase.

[Claim 26] It is a reaction mixture according to claim 25, and said acceptor saccharide is Glc (R) beta-O-R 1 here. Here R1 It is CH₂ n-COX, and;X is chosen from the group which consists of OH, OR₂, and -NHNH₂, and R is OH or NAc. -;R₂ Hydrogen, a saccharide, an oligosaccharide or the aglycon radical that has at least one carbon atom, and n are a reaction mixture which is the integer of 2-18.

[Claim 27] The reaction mixture according to claim 25 produced with the enzyme discovered from the exogenous gene to which said UDP-Gal carries out the code of UDP-Gal4' epimerase and the UDP-Glc pyrophosphorylase.

[Claim 28] a reaction mixture according to claim 1 -- it is -- here -- said cell -- following:a -- the reaction mixture which carries out the catalyst of the shift of the sugar from the enzyme system, and the b this 2nd nucleotidyl sugar for producing the 2nd nucleotidyl sugar at least to the product of said saccharide and which contains the 2nd recombination glycosyltransferase further at least.

[Claim 29] the reaction mixture of claim 28 -- it is -- here -- following: -- the reaction mixture said whose 2nd nucleotidyl sugar said 1st recombination glycosyltransferase is a GlcNAc transferase, and said 1st nucleotidyl sugar is UDP-GlcNAc, and; and said 2nd recombination glycosyltransferase are galactosyltransferases, and is UDP-galactose.

[Claim 30] The reaction mixture according to claim 29 with which said reaction mixture forms RAKUTO-N-neo tetrapod OSU (LNnT).

[Claim 31] The reaction mixture according to claim 1 with which said reaction mixture produces the 2nd

THIS PAGE BLANK (USPTO)

recombination glycosyltransferase which carries out the catalyst of the shift of sugar to the product of said saccharide from the :a 2nd nucleotidyl sugar and, and the b this 2nd nucleotidyl sugar below again and which contains the cell of the 2nd mold at least.

[Claim 32] The reaction mixture according to claim 31 said whose 1st glycosyltransferase is galactosyltransferase and said whose 2nd glycosyltransferase is a GalNAc transferase.

[Claim 33] the reaction mixture of claim 31 -- it is -- here -- following: -- said 1st cell type -- rearranging -- beta 1, a 4-GalNAc transferase, and the reaction mixture with which it rearranges, and; and said 2nd cell type rearrange, and contain alpha 2, 3-sialyltransferase, and a CMP-sialic acid including beta 1, a 4-Gal transferase, UDP-GalNAc, and UDP-Gal.

[Claim 34] The reaction mixture according to claim 33 produced from CPT and GlcNAc by the enzyme system in said 2nd cell type in which said CMP-sialic acid contains recombination enzyme CMP-sialic-acid synthetase, GlcNAc epimerase, NeuAc aldolase, and CMP-synthetase.

[Claim 35] The reaction mixture according to claim 33 said whose acceptor saccharide is lactosylceramide or RISO-lactosylceramide and whose product of a saccharide is ganglioside GM2.

[Claim 36] The reaction mixture according to claim 33 with which said 2nd cell type rearranges and contains alpha 2 and 8-sialyltransferase further.

[Claim 37] The reaction mixture according to claim 36 said whose acceptor is lactosylceramide or RISO-lactosylceramide and whose product of said saccharide is GD2.

[Claim 38] The reaction mixture according to claim 1 with which said reaction mixture contains the cell of the 2nd mold which is produced by said 1st type of cell, and which produces the nucleotide by which it is compounded from said nucleotidyl sugar again.

[Claim 39] The nucleotide which is a reaction mixture according to claim 38, and is produced by said 2nd cell type here, and corresponding nucleotidyl sugar are :UTP:UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-glucuronic acid, or an UDP-galacturonic acid below.;

GTP:GDP-Fuc; and a CPT:CMP-sialic acid -- since -- the reaction mixture chosen from the becoming group.

[Claim 40] It is the cell which produces the product of a saccharide and this cell is the following here. : a Recombination gene which carries out the code of the glycosyltransferase;

b) enzyme system [for forming the nucleotidyl sugar which is a substrate to this glycosyltransferase]; -- and -- c Exogenous saccharide acceptor partial;

It is the cell which this glycosyltransferase carries out the catalyst of the shift to this acceptor part from this nucleotidyl sugar an implication and here, and produces the product of this saccharide.

[Claim 41] The cell according to claim 40 in which said enzyme system for forming nucleotidyl sugar contains the cycle enzyme for reproducing this nucleotidyl sugar.

[Claim 42] The cell according to claim 40 said whose recombination gene which carries out the code of the glycosyltransferase is a heterologous gene.

[Claim 43] The cell according to claim 40 which forms said nucleotidyl sugar on the level on which said cell went up as compared with the wild type cell.

[Claim 44] The cell according to claim 43 which the level on which said nucleotidyl sugar went up produces from the deficit of the capacity of a cell to incorporate this nucleotidyl sugar to the polysaccharide usually produced by said cell.

[Claim 45] The cell according to claim 44 which is what said deficit depends on the level on which polysaccharide glycosyltransferase activity decreased.

[Claim 46] The cell according to claim 40 by which the product of said saccharide is produced at least by the concentration of about 1 mM.

[Claim 47] The cell according to claim 40 in which said enzyme system for forming nucleotidyl sugar contains the enzyme in which a code is carried out by the heterologous gene.

[Claim 48] The enzyme is a cell according to claim 47 and a code is carried out [an enzyme] by said heterologous gene here is following:GDP mannose DEHIDOROTAZE, GDP mannose 3, 5-epimerase, and GDP mannose 4-reductase.;

UDP-galactose 4' epimerase;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

UDP-GalNAc4' epimerase;

CMP-sialic-acid synthetase;

Pyrophosphorylase chosen from the group which consists of UDP-Glc pyrophosphorylase, UDP-Gal pyrophosphorylase, UDP-GalNAc pyrophosphorylase, GDP-mannose-pyrophosphorylase, and UDP-GlcNAc pyrophosphorylase;;

Kinase chosen from the group which consists of myokinase, a pyruvate kinase, acetyl kinase, and creatine kinase;

The cell which is one or more of UDP-Glc dehydrogenase and UDP-Gal dehydrogenase; and the pyruvate decarboxylase **s.

[Claim 49] The cell according to claim 48 said whose nucleotidyl sugar is GDP-fucose.

[Claim 50] It is a cell including the enzyme system which is the cell which produces sulfation polysaccharide and produces heterologous gene; and PAPS to which this cell carries out the code of the sulfotransferase here.

[Claim 51] The cell according to claim 50 chosen from the group which said sulfation polysaccharide becomes from a heparin sulfuric acid and carrageenin.

[Claim 52] The cell according to claim 50 in which said enzyme system which produces PAPS contains one or more enzymes discovered from an exogenous gene.

[Claim 53] It is the approach of producing the product of a saccharide, this approach includes the process which contacts a microbial cell or a plant cell to an acceptor saccharide here, and this cell is the following here. : a The enzyme system for forming nucleotidyl sugar; it reaches. b Approach containing the recombination glycosyltransferase which carries out the catalyst of the shift of sugar to this acceptor saccharide from this nucleotidyl sugar, and produces the product of a saccharide.

[Claim 54] The approach according to claim 53 by which the code of said glycosyltransferase is carried out by the heterologous gene.

[Claim 55] The approach according to claim 53 produced by said cell on the level on which the code of said glycosyltransferase was carried out to said cell by the gene which is exogenism, and it went up as compared with the cell wild type.

[Claim 56] The approach according to claim 53 by which the product of said saccharide is produced by the concentration of about 1 mM at least.

[Claim 57] The approach according to claim 53 by which said cell is transparency--ization-processed.

[Claim 58] The approach according to claim 53 said cell is an intact cell.

[Claim 59] The approach according to claim 53 said enzyme system for forming nucleotidyl sugar contains the enzyme in which a code is carried out by the heterologous gene.

[Claim 60] The enzyme is an approach according to claim 59 and a code is carried out [an enzyme] by said heterologous gene here is following:GDP mannose dehydratase, the GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose 3, 5-epimerase, and GDP. - Keto-6-deoxy-L-glucose 4-reductase;

UDP-galactose 4' epimerase;

UDP-GalNAc4' epimerase;

CMP-sialic-acid synthetase;

Pyrophosphorylase chosen from the group which consists of UDP-Glc pyrophosphorylase, UDP-Gal pyrophosphorylase, UDP-GalNAc pyrophosphorylase, GDP mannose pyrophosphorylase, and UDP-GlcNAc pyrophosphorylase; kinase chosen from the group which consists of MIKOKINAZE, a pyruvate kinase, acetyl kinase, and creatine kinase;

How to be one or more of UDP-Glc dehydrogenase and UDP-Gal dehydrogenase; and the pyruvate decarboxylase **s.

[Claim 61] The approach according to claim 59 by which said enzyme for forming nucleotidyl sugar and a glycosyltransferase are discovered as fusion protein.

[Claim 62] The approach according to claim 61 said fusion protein includes CMP-sialic-acid synthetase activity and sialyltransferase activity.

[Claim 63] The approach according to claim 61 said fusion protein includes galactosyltransferase activity and UDP-Gal4' epimerase activity.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Claim 64] The approach according to claim 61 said fusion protein includes GalNAc transferase activity and UDP-GlcNAc4' epimerase activity.

[Claim 65] The approach according to claim 53 said nucleotidyl sugar is GDP-fucose and said glycosyltransferase is fucosyltransferase.

[Claim 66] The approach according to claim 53 of forming nucleotidyl sugar on the level on which said cell went up as compared with the wild type.

[Claim 67] The approach according to claim 66 which the level on which said nucleotidyl sugar went up produces from the deficit of the capacity of this cell to incorporate this nucleotidyl sugar into the polysaccharide usually produced by said cell.

[Claim 68] The approach according to claim 67 of being what said deficit depends on the level on which polysaccharide glycosyltransferase activity decreased.

[Claim 69] It is the approach indicated by claim 53, and is here, and said cell/nucleotidyl sugar are :Azotobacter below. vinelandii/GDP-Man;

A Pseudomonas kind / UDP-Glc, and GDP-Man;

A Rhizobium kind / UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man;

An Erwinia kind / UDP-Gal, UDP-Glc;

An Escherichia kind / UDP-GlcNAc, UDP-Gal, CMP-NeuAc, GDP-Fuc;

A Klebsiella kind / UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-GlcNAc;

Hansenula jadinii/GDP-Man, GDP-Fuc;

Candida famata/UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc;

Saccharomyces cerevisiae/UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man, GDP-GlcNAc; and X.campesti/UDP-Glc, and GDP-Man -- since -- approach chosen from the becoming group.

[Claim 70] Said cell is Azotobacter. Approach according to claim 53 it is Vinelandii, said nucleotidyl sugar is GDP mannose, said acceptor saccharide is a lactose, and said glycosyltransferase is mannosyltransferase, and the product of said saccharide is a MANNO sill lactose.

[Claim 71] Said cell is E.coli, said nucleotidyl sugar is a CMP-sialic acid, said acceptor saccharide is a lactose, said glycosyltransferase is a sialyltransferase, and the product of said saccharide is sialyl lactose **** and an approach according to claim 53.

[Claim 72] It is an approach for compounding heparin, a heparan sulfate, and the related saccharide frame about a compound. Here this approach It is the process at which the acceptor saccharide containing end glucuronic acid or GlcNAc residue and a reaction mixture are contacted. Here this reaction mixture Following: The microbial cell or plant cell containing the following: a The enzyme system for forming UDP-GlcNAc; it reaches. b The catalyst of the shift of UDP-GlcNAc to the end glucuronic acid on this acceptor saccharide from this UDP-GlcNAc is carried out. Produce the acceptor saccharide containing end GlcNAc residue. Recombination GlcNAc transferase; and the following The included microbial cell or plant cell: a The enzyme system for forming UDP-glucuronic acid; it reaches. b The catalyst of the shift of the glucuronic acid from this UDP-glucuronic acid to the end GlcNAc residue on this acceptor saccharide is carried out. Recombination glucuronic acid transferase which produces the acceptor saccharide containing end glucuronic acid residue; How to include the process which continues *****, a process, and this reaction until this saccharide frame is compounded.

[Claim 73] It is an approach according to claim 72, and said reaction mixture is the following here. : a Enzyme system for forming UDP-GlcNAc and UDP-glucuronic acid;

b) Recombination GlcNAc transferase; reach. c Approach containing the single cell type containing a recombination glucuronic acid transferase.

[Claim 74] The approach which has said enzyme system for forming UDP-glucuronic acid and a recombination glucuronic acid transferase in the 2nd cell type by said enzyme system for being an approach according to claim 72 and forming UDP-GlcNAc and a recombination GlcNAc transferase here being in the 1st cell type.

[Claim 75] The approach according to claim 72 of containing the sugar nucleotide regenerative cycle of ***** again with perfect either for producing UDP-GlcNAc and UDP-glucuronic acid or said both

THIS PAGE BLANK (USPTO)

enzyme systems.

[Claim 76] It is an approach for compounding heparin, a heparan sulfate, and a related compound. Here this approach The process at which a HEPARAN polysaccharide frame and the reaction mixture containing a microbial cell or a plant cell are contacted is included. This microbial cell or a plant cell Following: a The enzyme system for forming PAPS; it reaches. b Approach containing the recombination sulfotransferase which carries out the catalyst of the shift for the sulfuric acid from this PAPS to this HEPARAN polysaccharide frame, and produces N-sulfation polysaccharide.

[Claim 77] The approach according to claim 76 said enzyme system for forming PAPS includes a PAPS cycle.

[Claim 78] The approach are an approach according to claim 76, and this approach contacts said N-sulfation polysaccharide and glucuronic acid 5'-epimerase, and includes the process which converts one or more glucuronic acid residue in said polysaccharide frame into iduronic acid here.

[Claim 79] said glucuronic acid 5' epimerase -- this glucuronic acid 5' -- the approach according to claim 78 discovered by the cell which exists in said reaction mixture containing the gene which carries out the code of the epimerase.

[Claim 80] It is the approach of including further the process which is an approach according to claim 78, and this approach contacts said iduronic acid content N-sulfation polysaccharide and one or more O-sulfonyl transferases here, and forms a heparan sulfate.

[Claim 81] The approach which is an approach according to claim 80 and is discovered by the cell in which said O-sulfotransferase contains the gene which carries out the code of the O-sulfotransferase here, and which exists in said reaction mixture.

[Claim 82] The approach according to claim 81 said cell which discovers said O-sulfotransferase includes the enzyme system for forming PAPS further.

[Claim 83] The acceptor saccharide in which it is an approach according to claim 76, and said HEPARAN polysaccharide frame contains :end glucuronic acid or GlcNAc residue below here, It is the process at which a reaction mixture is contacted. Here this reaction mixture following: 1 The microbial cell containing the following, or plant cell: a enzyme system [for forming UDP-GlcNAc]; -- and -- b The catalyst of the shift of GlcNAc to the end glucuronic acid on this acceptor saccharide from this UDP-GlcNAc is carried out. Produce the acceptor saccharide containing end GlcNAc residue. recombination GlcNAc transferase; -- and -- 2 The microbial cell containing the following, or plant cell: a enzyme system [for forming UDP-glucuronic acid]; -- and -- b The catalyst of the shift of the glucuronic acid from this UDP-glucuronic acid to the end GlcNAc residue on this acceptor saccharide is carried out. Recombination glucuronic acid transferase which produces the acceptor saccharide containing end glucuronic acid residue;

The approach of being acquired by the approach which includes the process which continues *****, a process, and this reaction until this saccharide frame is compounded.

[Claim 84] The approach which it is an approach according to claim 72, and this approach processes a HEPARAN polysaccharide frame by the base here, and sulfurates a HEPARAN polysaccharide frame chemically and forms N-sulfation HEPARAN polysaccharide frame and which includes a process further.

[Claim 85] It is the approach of including further the process which is an approach according to claim 84, and this approach contacts said N-sulfation polysaccharide and glucuronic acid 5'-epimerase here, and converts one or more glucuronic acid residue in said polysaccharide frame into iduronic acid.

[Claim 86] It is the approach of including further the process which is an approach according to claim 85, and this approach contacts said iduronic acid content N-sulfation polysaccharide to one or more O-sulfotransferase here, and forms a heparan sulfate.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

(Background of invention)

(Field of invention)

This invention relates to the enzymatic synthesis of a saccharide (oligosaccharide is included) product. Especially this invention relates to the activity of the cell which compounds the reactant used for the cell and glycosyltransferase catalyst saccharide composition which discover a glycosyltransferase. This approach enables composition of the product of the complex saccharide within a single container which uses available comparatively cheap starting material easily.

[0002]

(Background)

Although the oligosaccharide which has the branching structure and various association which a monomer can connect mutually sends information in a short array, it has bigger possibility than other biology oligomer of arbitration. Bacteria count will have been carried out if there are more permutations of the isomer about TORISAKKARIDO which consists of three hexoses than 38,000 (Laine(1994) Glycobiology 4:1-9). When this count is expanded replaceable [three hexoses which have sugar of 20 with which it is most generally found out], the number of possible permutations goes up until straight chain structure and branching structure exceed 9 million.

[0003]

The effectiveness of many oligosaccharide isomers enables many evolution of a receptor-oligosaccharide pair which interacts in a specific format to altitude. For the isomer permutation from which these many differ, at least a part plays an important role in various biological interactions with an extensive carbohydrate. For example, a carbohydrate functions as a recognition element which produces association with the leucocyte to each ligand, and other cells. A carbohydrate can work as a receptor to the drugs of infectivity, and is contained in self-recognition again. A carbohydrate is often contained in a signal device.

[0004]

An understanding which the role of the carbohydrate in such a biological process increased produced the big demand about the approach of compounding desired carbohydrate structure. Although it is indispensable to the biological functions of a carbohydrate, possible connection of a large number which a carbohydrate can form complicates composition of a carbohydrate dramatically. For this reason, a glycosyltransferase and its role in enzymatic catalyst composition of a carbohydrate are studied by current large-scale. A glycosyltransferase shows high singularity and is useful in formation of the limited array and the carbohydrate structure of connection. The activity of the glycosyltransferase for the enzymatic synthesis of a carbohydrate offers the remarkable advantage substantially exceeding the chemical approach for perfect stereoselectivity and connection singularity offered with an enzyme (for example, refer to Ito et al., (1993) Pure Appl.Chem.65:753, U.S. Pat. No. 5,352,670, and 5,374,541). Therefore, a glycosyltransferase is increasingly used as an enzyme-catalyst in composition of many

THIS PAGE BLANK (USPTO)

carbohydrates used for the therapy-object and other objects.

[0005]

However, production of the commercial scale of a carbohydrate compound is complicated by the cost and the difficulty in the case of often obtaining the reactant used for the enzymatic synthesis of a carbohydrate, and chemical composition. or [that especially the nucleotidyl sugar used as a substrate to many glycosyltransferases is expensive] -- or it is difficult for obtaining. Furthermore, in order that composition may produce the oligosaccharide which requires many glycosyltransferases from 1, the need of obtaining and refining two or more glycosyltransferases may increase the cost and the complexity of composition of an oligosaccharide dramatically.

[0006]

Recently, the system use based on the cell about oligosaccharide composition was indicated. in order that Endo and others (1999) (Carbohydrate Res.316:179-183; -- refer to Koizumi et al. and (1998) Nature Biotechnology 16:847-850) may produce N-acetyl lactosamine, the activity of coupling of the combination of a different cell type is indicated, and each produces different glycosyltransferase nucleotidyl sugar. However, these approaches need various cell types to each reaction, and one produces a transferase, and others produce nucleotidyl sugar.

[0007]

An approach to have improved the enzymatic synthesis of a carbohydrate compound and the precursor used for these composition promote generation of many useful compounds. This invention fulfills these and other needs.

[0008]

(Summary of this invention)

This invention offers the approach of production of the reaction mixture of the cell base, a recombination cell, and the product of a saccharide. A reaction mixture carries out the catalyst of the shift of sugar to an acceptor saccharide from an acceptor saccharide, a nucleotidyl sugar, and b nucleotidyl sugar typically, and the first mold of the plant cell which produces the recombination glycosyltransferase which forms the product of a saccharide, respectively, or a microbial cell is mentioned. In an operation gestalt desirable now, a cell produces nucleotidyl sugar on high level rather than it is produced by the wild type cell. In some operation gestalten, a cell contains one or more outpatient department student genes which carry out the code of the enzyme contained in nucleotidyl sugar composition.

[0009]

This invention offers the approach and reaction mixture of the cell base in case various saccharide connection is carried out again. Some methods of attaining this are offered. For example, this invention offers the cell which more recombination glycosyltransferases than 1 discover. In some situations, both glycosyltransferases use the same nucleotidyl sugar. For example, anti-invention offers the cell which discovers two recombination galactosyltransferases (for example, alpha 1, 3-glycosyltransferase and beta 1, 4-glycosyltransferase), and these both use UDP-galactose as a sugar donor. In other operation gestalten, each of the recombination glycosyltransferase produced by the cell requires different nucleotidyl sugar (for example, the cell which discovers a GalNAc transferase and galactosyltransferase produces both UDP-GalNAc and UDP-Gal).

[0010]

Two or more glycoside connection may be obtained by using a reaction mixture. this reaction mixture -- the first cell type -- in addition -- respectively -- a -- the catalyst of the shift of sugar to the saccharide produced by the first glycosyltransferase reaction at least from the second nucleotidyl sugar, and the b second nucleotidyl sugar is carried out -- the second recombination glycosyltransferase is produced at least -- the second cell type is included at least. For example, the reaction mixture of this invention may contain the cell which produces recombination galactosyltransferase and a GlcNAc transferase with the second cell type which produces a recombination sialyltransferase and a CMP-sialic acid with corresponding nucleotidyl sugar.

[0011]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In some operation gestalten of this invention, a reaction mixture contains one or more cell types which produce the recombination enzyme which carries out the catalyst of the whole or some nucleotidyl sugar regenerative cycles. These cells are useful in order to reproduce a sugar nucleotide, and as for these, they are comparatively more expensive than cheap starting material. When a sugar nucleotide is consumed, a nucleoside and other reaction components are reused and produce the further sugar nucleotide.

Therefore, the amount of the product of the saccharide obtained from a reaction increases.

[0012]

The further operation gestalt of this invention offers the reaction mixture in the case of being produced by the cell type of an except, when one or more reactants for nucleotidyl sugar composition produce the enzyme which carries out the catalyst of the composition. For example, the reaction mixture of this invention may contain one cell type which produces a nucleotide with another cell type which offers nucleotidyl sugar synthetase. Moreover, one cell type can offer a nucleotide precursor and, on the other hand, another cell type produces the enzyme contained in composition of a nucleotide.

[0013]

This invention offers the cell and reaction mixture with which a cell type produces fusion protein including the catalyst domain of a glycosyltransferase, and the catalyst domain of an enzyme included in composition of the nucleotidyl sugar committed as a sugar donor about a glycosyltransferase again. The example of instantiation-is a cell which produces the fusion protein with which the catalyst domain of a sialyltransferase is found out with the catalyst domain of CMP-sialic-acid synthetase.

[0014]

This invention offers the recombination cell for compounding heparin, a heparan sulfate, and a related compound, a reaction mixture, and an approach again. In some operation gestalten, this invention offers the cell and reaction mixture for the activity in the approach for compounding the polysaccharide frame about heparin, a heparan sulfate, and a related compound. These approaches Terminal glucuronic acid or GlcNAc residue the included acceptor saccharide includes the process in contact with the reaction mixture containing the following : The microbial cell containing the following, or plant cell: enzyme system [for forming aUDP-GlcNAc]; -- and -- In order to produce the acceptor saccharide containing b terminal GlcNAc residue The recombination GlcNAc transferase which carries out the catalyst of the shift to terminal glucuronic acid from UDP-GlcNAc of GlcNAc on an acceptor saccharide; in a row The microbial cell or plant cell containing the following: a UDP-glucuronic acid The enzyme system for forming; it reaches. In order to produce the acceptor saccharide containing b terminal glucuronic acid residue The recombination glucuronic acid transferase which carries out the catalyst of the shift to terminal GlcNAc residue from the UDP-glucuronic acid of the glucuronic acid on an acceptor saccharide; in a row Process which a reaction advances until a polysaccharide frame is compounded.

[0015]

The reaction mixture and approach for compounding a reaction mixture and heparin, a heparan sulfate, and a related compound are also offered by presenting N-sulfation, epimerization, and/or O-sulfation with a HEPARAN polysaccharide frame. A HEPARAN saccharide frame is N by either of the enzyme-sulfurating methods including the process contacted to the reaction mixture containing the microbial cell which base-processes, and contains the following (a) and (b) for chemical sulfation or a HEPARAN polysaccharide frame continuously, or a plant cell. - It may be sulfurated. : The enzyme system for forming aPAPS; it reaches. Recombination sulfotransferase which carries out the catalyst of the shift to a HEPARAN polysaccharide from PAPS of sulfate in order to produce a bN-sulfation polysaccharide. In an operation gestalt desirable now, the enzyme system for forming PAPS contains a PAPS cycle.

[0016]

The approach for compounding a heparan sulfate, heparin, carrageenin (carragenin), and a related compound contacts N-sulfation polysaccharide to glucuronic acid 5'-epimerase, and may include further the process which changes one or more glucuronic acid residue in a polysaccharide frame into iduronic acid. The iduronic acid content N-sulfation polysaccharide obtained is contacted one by one with one or more O-sulfotransferase, and can form a heparan sulfate. Both epimerase, and both [either or] may be produced by the recombination cell which exists in this reaction mixture.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0017]

(Detailed explanation)

(Definition)

Generally, the cell of this invention, the reaction mixture, and the approach are useful in order to produce the product of a saccharide by shifting a mono-saccharide or a sulfate radical to an acceptor molecule from a donor substrate. Generally addition takes place at the nonreduction end of the oligosaccharide on a living thing molecule, polysaccharides (for example, heparin, carrageenin, etc.), or a carbohydrate part. It is like a carbohydrate, protein (for example, glycoprotein), and a lipid (for example, a glycolipid, phospholipid, sphingolipid, and ganglioside) as a living thing molecule which is defined in this description -- although an important molecule is mentioned biologically, it is not limited to these.

[0018]

The following abbreviations are used in this description. : Ara= arabino sill;

Fru= FURUKU tosyl;

Fuc= fucosyl;

Gal= galactosyl;

GalNAc=N-acetyl GARAKUTOSAMINIRU;

Glc= glycosyl;

GlcNAc=N-acetyl guru KOSAMINIRU;

Man= MANNOSHIRU; it reaches. NeuAc= sialyl (N-acetyl noy lamination nil).

[0019]

Typically, a sialic acid is 5-N-acetyl neuraminic acid or (NeuAc) 5-N-glycolylneuraminic acid (NeuGc). However, other sialic acids may be used instead. It is related with the total theory of a gestalt that the suitable sialic acids in this invention differ, and they are Schauer and Methods. in Enzymology, 50:64-89 (1987) and Schaur, Advances in Carbohydrate Chemistry and Refer to Biochemistry and 40:131-234.

[0020]

The donor substrate about a glycosyltransferase is the activated nucleotidyl sugar. Generally such activated sugar consists of a derivative of the sugar which a uridine, guanosine 2 phosphoric acid and cytidine 1 phosphoric acid, nucleoside 2 phosphoric acid, or 1 phosphoric acid commits as a leaving group. The nucleotidyl sugar with which others were activated can sometimes be used for a bacteria system, a vegetable system, and a fungus system.

[0021]

An oligosaccharide is not concerned with whether the saccharides of a reducing terminal are reducing sugar actually, but it is considered that it has a reducing terminal and a nonreduction end. According to the accepted nomenclature, a nonreduction end is followed on left-hand side, it follows a reducing terminal on right-hand side, and an oligosaccharide is illustrated in this description. the ring of the name with which, as for all the oligosaccharides indicated in this description, nonreducing sugars (for example, Gal) are related or an abbreviated name, and the reducing sugars which participate in a glycosidic linkage (alpha or beta), ring association, and association succeedingly -- subsequently it is indicated with the name or abbreviated name of reducing sugars (for example, GlcNAc). the connection between two sugar (2, 3, and 2->3 -- or (2 3)) may be shown. [for example,] Each saccharide is a pyranose or a furanose.

[0022]

Many of nomenclatures demanded in this application and general laboratory procedures are Sambrook et al. and Molecular. Cloning: A Laboratory Manual (the 2nd edition), one to three volumes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York and 1989. In this manual, reference is made with "Sambrook and others" below in the inside of this description.

[0023]

The vocabulary "a nucleic acid" contains a nucleic acid and the well-known analog of the natural nucleotide to hybridize in the format of the nucleotide which exists naturally, and resemblance, unless it

THIS PAGE BLANK (USPTO)

says one of the deoxyribonucleotide polymers or ribonucleotide polymers of a single strand gestalt or a double strand gestalt and is limited to others. Unless it is shown in others, a specific nucleic-acid array includes the complementary sequence.

[0024]

The vocabulary "connected possible [actuation]" says the functional connection between a nucleic-acid manifestation control array (for example, array of a promotor, a signal sequence, or a transcription factor binding site), and the second nucleic-acid array, and a manifestation control array influences the imprint and/or translation of a nucleic acid corresponding to the second array here.

[0025]

When used about a cell, the vocabulary "recombination" shows that the peptide or protein by which a cell reproduces a different-species nucleic acid, or a code is carried out with a different-species nucleic acid is discovered. A recombination cell may contain the gene which is not found out by the native (non-recombination) mold of a cell. A recombination cell may contain the gene found out by the native mold of a cell again, and a gene is changed here, and it is reintroduced into a cell by the artificial means. ; containing the cell which contains the nucleic acid of internality in the cell changed without this vocabulary removing diffusion from a cell again -- such an alteration contains gene substitution, site-directed mutagenesis, and the thing obtained by the related technique.

[0026]

A "recombination nucleic acid" says the nucleic acid (for example, formed of connection of the nucleic-acid fragmentation which exists in two nature, or synthetic nucleic-acid fragmentation) built artificially. This vocabulary is applied to the nucleic acid produced by the duplicate or imprint of the nucleic acid built artificially again. A "recombination polypeptide" is discovered by the imprint of a recombination nucleic acid (namely, nucleic acid changed from the gestalt which exists in the nucleic acid which is not native into a cell, or its nature), and translation of the imprint object which might continue.

[0027]

The "different-species polynucleotide" or the "different-species nucleic acid" used in this description makes a specific host cell from a foreign supply source, and, in the same supply source origin, is changed from the original gestalt. Therefore, the different-species glycosyltransferase gene in a procaryote host cell contains the glycosyltransferase gene changed by the specific host cell although it was internality. The alteration of a different-species array may arise. For example, by processing DNA using a restriction enzyme and producing the DNA fragment which may be connected with a promotor possible [actuation], a technique like site-directed mutagenesis is useful again in order to change a different-species array.

[0028]

The array of the nucleic acid or amino acid with which a "partial array" includes a part of long array of a nucleic acid or amino acid (for example, polypeptide), respectively is said.

[0029]

It is the recombination nucleic-acid structure produced by the resultant using the "recombination manifestation cassette" or nucleic-acid element with which a "manifestation cassette" may only influence the manifestation of the structural gene in the host of such an array and compatibility. A manifestation cassette contains an imprint stop signal in a promotor and arbitration at least. Typically, a recombination manifestation cassette contains the nucleic acid (for example, nucleic acid which carries out the code of the desired polypeptide) imprinted, and a promotor. The need or the further useful factor may be used for achieving a manifestation again so that it may be indicated in this description. For example, a manifestation cassette includes the nucleotide sequence which carries out the code of the signal sequence which points to secretion of the protein discovered from the host cell again. Other nucleic-acid arrays which influence an imprint stop signal, an enhancer, and gene expression may be included in a manifestation cassette again.

[0030]

The "fusion glycosyltransferase polypeptide" of this invention is a polypeptide including a glycosyltransferase catalyst domain and the second catalyst domain of the accessory enzyme (for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

example, CMP-Neu5Ac synthetase or UDP-glucose 4' epimerase (galE)) origin. A fusion polypeptide can carry out the catalyst of composition of a sugar nucleotide (for example, CMP-NeuAc or UDP-Gal), and the shift of sugar residue to an acceptor molecule from a sugar nucleotide. Typically, the catalyst domain of a fusion polypeptide is substantially the same at least in the catalyst domain of the glycosyltransferase and fusion protein with which a catalyst domain is guided.

[0031]

An "accessory enzyme" in case reference is made in this description is an enzyme which participates in carrying out the catalyst of the reaction (for example, the substrate or other reactants about a glycosyltransferase reaction being formed). An accessory enzyme can carry out the catalyst of the formation of the nucleotidyl sugar used by the glycosyltransferase as a sugar donor part. An accessory enzyme may be used for production of the nucleotide 3 phosphoric acid required of formation of nucleotidyl sugar, or production of the sugar built into nucleotidyl sugar again.

[0032]

The part of enough enzymes for a "catalyst domain" to carry out the catalyst of the enzyme-reaction usually carried out with an enzyme is said. For example, since sialic-acid residue is shifted to an acceptor saccharide from a sugar donor, the catalyst domain of a sialyltransferase contains the part of sufficient sialyltransferase. A catalyst domain may include the further amino acid sequence which does not contact an enzyme or a partial array so that the whole enzyme and its partial array may be included or it may be found out naturally.

[0033]

The ingredient which is not substantially [the vocabulary "isolated" / the component which interferes in the activity of an enzyme], or intrinsically is said. The ingredient which is not normally substantially [the vocabulary "isolated" / the component accompanied by an ingredient which is found out in the native condition], or intrinsically is said about the cell of this invention, a saccharide, a nucleic acid, and a polypeptide. the case where the saccharide, the protein, or the nucleic acid from which this invention was isolated is typically measured by other approaches for determining the reinforcement or purity of a band on the gel which carried out the argentation -- at least -- about 80% purity -- usually -- at least -- about 90% -- and it is pure about 95% at least preferably. Purity or homogeneity may be shown in the field concerned by many well-known approaches (for example, visualization by the polyacrylamide gel electrophoresis of a protein sample or a nucleic-acid sample, and continuing dyeing). About the specific object, a high resolution is needed and HPLC or the similar purification approach is used.

[0034]

When the vocabulary "the same" or percent "identity" is measured about two or more nucleic-acid arrays or polypeptide arrays using one of the following array comparison algorithms, or when comparing and aligning about the greatest response by visual inspection, the specific percent of the two or more same arrays, a partial array, the same amino acid residue, or a nucleotide is said.

[0035]

It is related with two or more nucleic acids or polypeptides, and when measured using one of the following array comparison algorithms, or when comparing and aligning about the greatest response by visual inspection, two or more the arrays or partial arrays which have nucleotide identity or amino-acid-residue identity 90 - 95% most preferably are said [phrase / "substantially the same"] 80% preferably at least 60%. Substantial identity exists over the field of the array of the die length of about 50 residue preferably at least, and it migrates to the field of about 100 residue at least more preferably, and this array is substantially the same over about 150 residue most preferably at least. In the most desirable operation gestalt, the array is substantially the same covering the die length of the whole coding region.

[0036]

About an array comparison, typically, one array works as a reference array and it is compared with a test array. When using an array comparison algorithm, a test array and a reference array are inputted into a computer, if required, a partial array coordinate will be designed, and array algorithm program parameter is designed. Subsequently, an array comparison algorithm calculates the percent array identity about the test array over a reference array based on the designed program parameter.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0037]

Alignment of the arbitration of the array for a comparison For example, Smith and Waterman, With the partial homology algorithm of Adv.Appl.Math.2:482 (1981) With Needleman and Wunsch, and the homology alignment algorithm of J.Mol.Biol.48:443 (1970) Pearson and Lipman, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA With the similarity search method of 85:2444 (1988) Activation which these algorithms computerized () [Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group,] [575 Science] Dr., Madison, GAP of WI, BESTFIT, FASTA, and TFASTA or a sight-check (it Biolog(ies) Current Protocols in Molecular [] --) F. M.Ausubel et al., **, Current Protocols, Greene Publishing Associates, and Inc. and John the venture (1995 supplement) (Ausubel) of solidarity between Wiley&Sos and Inc. -- general -- referring to -- it may be carried out.

[0038]

The example of a suitable algorithm to determine percent array identity and similarity is a BLAST algorithm and BLAST. It is 2.0 algorithms and these are [Altschul et al. (1990), J.Mol.Biol.215:403-410 (1990), and Altschuel / Nucleic] (1977). Acid It is indicated by Res.25:3389-3402, respectively. The software for performing BLAST analysis is National. Center for Biotechnology It is publicly available through Information (HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. When this aligns with the WORD of the same die length under database array including this algorithm identifying a high scoring array pair (HSP) first by identifying the short WORD (word) of die-length W under array of an inquiry, it is in agreement with some forward threshold scores T, or satisfied. T is called contiguity WORD score threshold (Altschul et al., above). These initial contiguity WORD hits act as seed for the retrieval initiation for finding [rather than] out long HSP including them. Subsequently, as long as an accumulation alignment score may increase, a WORD hit meets each array and is elongated to both directions. An accumulation score is calculated about a nucleotide sequence using Parameters M (compensation score; to the pair of residue in agreement always > 0), and N (penalty score; to the residue of an inequality always <0). About an amino acid sequence, in order that a scoring matrix may calculate an accumulation score, it is used. Expanding of the WORD hit in each direction originates in are recording of the negative scoring residue alignment beyond;1 ** to which only an amount X decreases from the value to which :accumulation alignment score which is suspended in the following cases reached the max, and the end of; from which an accumulation score becomes less than [zero or it], or a thing [any] array reaches. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensibility and the rate of alignment. A BLASTN program uses the comparison of the word length (W) of 11, the expected value (E) of 10, M= 5, N= 4, and both chains as a default (nucleotide sequence). About an amino acid sequence, a BLASTP program uses the word length (W) of 3, the expected value (E) of 10, and a BLOSUM62 scoring matrix as a default parameter (refer to Henikoff and Henikoff, and Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915 (1989)).

[0039]

In addition to calculating percent identity, a BLAST algorithm performs statistical analysis of the similarity between two arrays again (for example, refer to Karlin and Altschul, and Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:5873-5787 (1993)). One scale of the similarity offered by the BLAST algorithm is the minimum sum total probability (smallest sum probability) (P (N)), and this offers the index of the probability for coincidence between two nucleotide sequences or an amino acid sequence to arise by chance. For example, less than about 0.1, more preferably, less than about 0.01 and when it is less than about 0.001 most preferably, it considers that the minimum sum total probability in a comparison of as opposed to the criteria nucleic acid of a trial nucleic acid in a nucleic acid is similar to a criteria array.

[0040]

The further index [polypeptide / two nucleic-acid arrays or] substantially of being the same is that the polypeptide by which a code is carried out with the first nucleic acid carries out a cross reaction to the polypeptide by which a code is carried out with the second nucleic acid immunologically so that it may be indicated below. When it follows, for example, two peptides change only with conservative substitution, the polypeptide is substantially the same to the second polypeptide typically. Substantially,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

like the publication to the following of two molecules, under stringent conditions, I hear that two nucleic-acid arrays hybridize the same another index mutually, and it has them. [0041]

When an array exists in the complex mixture (for example, cell whole) DNA and RNA, it says [phrase / "it hybridizes specifically"] combining a molecule only with a specific nucleotide sequence under stringent conditions, double-strand-izing, or hybridizing.

[0042]

Although a probe hybridizes the vocabulary "stringent conditions" with the target sequence, it says conditions which do not hybridize which other arrays. stringent conditions -- an array -- it is anacletic and differs in a different environment. A longer array is specifically hybridized at higher temperature. Generally, in the ionic strength and pH which were specified, about 5 degrees C of stringent conditions are low chosen from the heat melting point (T_m) of a specific array. T_m is temperature (setting to the ionic strength, pH, and nucleic-acid concentration which were specified) which 50% of a probe complementary to a target sequence hybridizes to a target sequence by the equilibrium state. (Generally, when a target sequence exists too much in T_m , 50% of a probe is equilibrium) . typical -- stringent conditions -- pH 7.0-8.3 -- salt concentration -- about -- Na^+ ion of under 1.0M -- it is -- typical -- about 0.01 -1.0M It is Na^+ ion concentration (or other salts), and they are the conditions which temperature is about 30 degrees C at least about a short probe (for example, ten to 50 nucleotide), and are about 60 degrees C at least about a long probe (for example, longer than 50 nucleotides). Stringent conditions may be attained again using addition of an instability agent like formaldehyde.

[0043]

A phrase "it joins together specifically" or "it is immunoreactivity specifically" say the ligation reaction which can determine existence of the protein or other antigens in existence of protein, a saccharide, and the different-species ensemble of other biologicals, when making reference about an antibody. Therefore, a specific antibody is preferentially combined with a specific antigen under the designed immunoassay conditions, and other molecules which exist in a sample and a significant amount are not combined. Specific association to the antigen under such conditions needs the antibody chosen about the singularity over a specific antigen. Various immunoassay formats may be used in order to choose a specific antigen and the antibody which is immunoreactivity specifically. For example, solid phase ELISA immunoassay may be idiomatically used, in order to choose as an antigen the monoclonal antibody which is immunoreactivity specifically. It is related with a format of the immunoassay which may be used in order to determine specific immunoreactivity, and the publication of conditions, and they are Harlow and Lane (1988), and Antibodies:A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publication, New Refer to York.

[0044]

"The variation changed in preservation" of a specific polynucleotide array says the same array intrinsically, when the same amino acid sequence or the polynucleotide which carries out the code of the same amino acid sequence intrinsically is said or a polynucleotide does not carry out the code of the amino acid sequence. For the degeneracy of a genetic code, the same nucleic acid carries out the code of the predetermined polynucleotide of arbitration functionally [many]. For example, all the codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, and AGG carry out the code of the amino acid arginine. Therefore, a codon may be changed into the codon to which the indicated arbitration corresponds in all the parts to which an arginine is specified by the codon, without changing the polypeptide by which the code was carried out. The variation of such a nucleic acid is a "silence permutation" or a "silence variation", and these are one of "the variations changed in preservation." All the polynucleotide arrays indicated in this description which carries out the code of the polypeptide indicate all possible silence variations again, unless it is warned by others. Therefore, a silence permutation is the description all the nucleic-acid arrays that carry out the code of the amino acid were indicated to be. This contractor understands the child who may be changed in order that each codon in a nucleic acid (except for AUG which is originally a codon only to a methionine) may obtain the same molecule functionally with a standard technique. In some operation gestalten, the nucleotide sequence which carries out the code of the enzyme is optimized for the manifestation in the specific host cells (for example, yeast, mammalian, vegetation, a fungus, etc.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

preferably used in order to produce an enzyme.

[0045]

1 in the amino acid sequence permuted by different amino acid which similarly has the dramatically similar description, or the "preservation-amino acid substitution" of some amino acid is easily identified noting that it is dramatically similar to the specific amino acid sequence or the specific nucleic-acid array which carries out the code of the amino acid again. Such a variation of the specific array of arbitration permuted in preservation is the description of this invention. Change, addition or each permutation that carries out deletion, deletion, or addition is "a variation changed in preservation" about the single amino acid in a coding sequence, or the amino acid of few percent (typically less than 5%, more typically less than 1%), and this change produces a permutation with similar amino acid chemically [amino acid]. The table of the conservative substitution which offers similar amino acid functionally is common knowledge in the field concerned. For example, Creighton (1984) Protein, W.H.Freeman and Refer to Company.

[0046]

(Explanation of a desirable operation gestalt)

This invention offers the approach of the cell base for compounding the product of a saccharide in enzyme. The reaction mixture useful to an approach and recombination cell for compounding the product of a saccharide are also offered. the nucleotidyl sugar which the cell which produces a recombination glycosyltransferase is used for this invention, and works as a sugar donor to a recombination glycosyltransferase -- also containing -- it produces. In an operation gestalt desirable now, the cell containing the enzyme needed for sugar nucleotide reuse by which nucleotidyl sugar is reproduced continuously is used for the reaction mixture of this invention. Unlike the available approach, this invention connects a nucleotidyl sugar reversion system to a recombination glycosyltransferase in a single recombination living thing or a single cell before for the saccharide composition like an enzyme. This invention is useful in order to produce the product (an oligosaccharide, a polysaccharide, RIPOORIGO sugar, lipopolysaccharide, ganglioside, other glycolipids, and a glycoprotein are included) of an extensive saccharide. The reaction mixture for disappearing, and sulfation polysaccharides (for example, heparin, a heparan sulfate, carrageenin, etc.) being, and carrying out them, a recombination cell, and an approach are also offered.

[0047]

Generally, the product of a saccharide is a recombination glycosyltransferase which carries out the catalyst of the shift of the enzyme system for producing :a nucleotidyl sugar produced by contacting an acceptor saccharide to at least one cell type containing the following and the sugar from nucleotidyl sugar to an acceptor saccharide, and produces the product of a saccharide. In order to produce the product of a saccharide by this invention, including the recombination cell which it is useful to this approach and is obtained, and a recombination cell, a useful reaction mixture is offered again. In order to produce a sulfation saccharide and other sulfation molecules, a reuse system is preferably used for this approach and a reaction mixture including at least one cell type which produces the recombination sulfotransferase and produces a sulfate donor (for example, PAPS) again.

[0048]

The reaction mixture and approach of the cell base of this invention offer the remarkable advantage for the enzymatic synthesis of an oligosaccharide which exceeds the available approach before. Often expensive and/or acquisition are difficult for the nucleotidyl sugar which works as a donor substrate to a glycosyltransferase in the first place. Therefore, I hear that the need of supplying the activated nucleotidyl sugar is excepted, and there is one advantage of this invention. The living thing of this invention can produce continuously the nucleotide which a sugar nucleotide and/or sugar add. In an operation gestalt desirable now, the reuse of the exhausted nucleotide produced by shift of the sugar from a sugar nucleotide between product formation may arise again. A living thing is because the enzyme-process which carries out the reconstitution of either a sugar nucleotide or a nucleotide is included. A recombination glycosyltransferase is produced by the cell again. Therefore, continuous production of a product may produce the initiation from a cheap source material. The need of refining all

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of an enzyme that participate in a glycosyltransferase or nucleotidyl sugar composition is twisted, and; cell is set in the reaction mixture which only has a suitable acceptor part and other suitable reactants required for glycosyltransferase activity.

[0049]

Therefore, it not only produces a specific glycosyltransferase, but it may attain quickness and comparatively cheap [quite efficient and] composition of the product of a desired saccharide through the activity of the cell which may have a nucleotidyl sugar donor compounded from the cheap reactant about a glycosyltransferase. The saccharide produced using the approach of this invention finds out many activities including a diagnostic activity and a therapy-activity (for example, hood staff).

[0050]

(A. Recombination cell which discovers a glycosyltransferase and nucleotidyl sugar synthetic enzyme) This invention offers the recombination cell which produces the nucleotidyl sugar which discovers at least one glycosyltransferase and may function as a sugar donor about a glycosyltransferase. Generally, the code of the glycosyltransferase is carried out with a different-species nucleic acid (namely, the nucleic acid which is not native into a cell or is changed from the intracellular native gestalt; such a glycosyltransferase is mentioned as "recombination", "exogenism", or a "different-species" glycosyltransferase in this description). A cell contains one or more exogenous genes which carry out the code of the enzyme which participates in composition of nucleotidyl sugar again if needed. Typically, an enzyme is a part of enzyme system for producing nucleotidyl sugar. A different-species nucleic acid may be a polynucleotide which is not endogenous, or is the alteration mold of the polynucleotide which is endogenous and is obtained into a cell at a cell. In some application, a cell contains more exogenous genes than 1 which carries out the code of the enzyme which participates in many exogenous glycosyltransferase genes and/or nucleotidyl sugar composition from 1.

[0051]

or [that the recombination cell of this invention generally produces the polynucleotide which carries out the code of the specific enzyme] -- or -- otherwise, it obtains, a polynucleotide for which it asks is changed, a polynucleotide is arranged to the manifestation cassette under control of a promotor and other suitable control signals, and it may be produced by introducing a manifestation cassette to a cell. More enzymes than 1 may be discovered in the same host intracellular by either of more expression vectors than 1 which exists in intracellular [the same expression vector or intracellular / same].

[0052]

(1. Glycosyltransferase)

The recombination cell of this invention contains at least one heterologous gene which carries out the code of the glycosyltransferase about the enzyme-saccharide composition including a glycosyltransferase reaction. As for many glycosyltransferases, it is well-known that they are polynucleotide arrays. For example, refer to "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases" (http://www.vei.co.uk/TGN/gt_guide.thm). The nucleotide sequence which carries out the code of the glycosyltransferase an amino acid sequence may be presumed to be is found out in an available database (GenBank, Swiss-Plot, EMBL, etc. are included) publicly [versatility] from a glycosyltransferase amino acid sequence and there again.

[0053]

The glycosyltransferase which may be used by intracellular [of this invention] is :galactosyltransferase which is not limited to them although the following is included, fucosyltransferase, glucosyltransferase, N-acetyl galactosaminyl transferase, N-acetyl GURUKOSAMI nil transferase, glucuronyl transferase, a sialyltransferase, mannosyotransferase, a glucuronic acid transferase, a glucuronic acid transferase, and an oligo SAKKARIRU transferase. A suitable glycosyltransferase contains what is obtained from eukaryote and a procaryote.

[0054]

For example, many mammalian glycosyltransferases are cloned, and it was discovered and recombination protein is characterized in respect of a donor and acceptor singularity. The glycosyltransferase is studied through site-directed mutagenesis in the attempt which carries out the base

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of the residue which participates in a donor or acceptor singularity again. It follows. Although the recombination cell which discovers fusion protein about which it argues in this description is produced Identification of a useful catalyst domain it is made easy (AokiEMBO(s)(1990).J.9:3171-3178; -- Harduin-Lepers et al. (1995) -- Glycobiology 5(8):741-758;Natsuka -- and Lowe(1994) Current Opinion in Structural Biology [4:683-691;Zu] .234:323-328;SetoJ(1997).Biol.Chem.272: (1995) Biochem.Biophys.Res.Comm. -- 206 (1) -- :362-369;SetoEur(s)(1995).J.Biochem -- 14133-141388.

[0055]

The method of obtaining a glycosyltransferase nucleic acid and such a nucleic acid is well-known to this contractor. Cloning of the glycosyltransferase nucleic acid (for example, cDNA, a genome, or a partial array (probe)) may be carried out, or it may be amplified by the in vitro approach (for example, polymerase chain reaction (PCR), a ligase chain reaction (LCR), magnification (transcription-based amplification system) (TAS) of the imprint base, a self-self-sustaining array duplicate system (SSR)). Extensive various cloning and the methodology of magnification by in vitro one are common knowledge at this contractor. The example of enough these techniques and descriptions to guide this contractor through many cloning drills :Berger and Kimmel, Guide which are found out below to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego and CA (Berger);Sambrook(s) (1989) Molecular Cloning-A Laboratory 1-3 Manual(s) (the 2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY,;(Sambrook et al.) Current Protocols in Molecular The volumes Biology and on F.M.Ausubel, Current Protocols, Greene Publishing Association, Inc. and John Wiley&Sons, the joint venture between Inc.; (Ausubel (1994 supplements)) [Cashion et al.,] U.S. Pat. No. 5,017,478; and Carr, the Europe patent No. 0,246,864. The example of sufficient technique to guide this contractor through the in vitro magnification approach :Berger and Sambrook which are found out below, and Ausubel, And Mulis U.S. Pat. No. 4,683,202 (1987) ;P CR Protocols A Guide to Methods and Applications(volumes on Innis) Academic Press Inc.San Diego, CA (1990) (Innis);Arnheim, and Levinson(October 1, 1990) C&EN36-47;The Journal Of NIH Research 3:81-94; (1991) () [Kwoh] (1989) Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 35: 86:1173 --;GuatelliProc(s) (1990).Nat'l.Acad.Sci.USA87 and 1874;LomellJ(1989).Clin.Chem. -- 1826;Landegren(s) (1988) Science 241:1077-1080;Van Brunt(1990) Biotechnology 8:291-294;Wu, Wallace(1989) Gene4:560;, and Barringer(s) (1990) Gene 89:117.

[0056]

Glycosyltransferase protein or DNA which carries out the code of the partial array, and DNA which carries out the code of the enzyme which participates in formation of the nucleotidyl sugar indicated below For example, suitable cloning of an array and a suitable limit, Narang et al. [or] Meth.Enzymol.68: (1979) The phosphotriester method of 90-99; Brown et al. Meth.Enzymol.68: (1979) The phosphodiester method of 109-151; Include the direct chemosynthesis by approach like BeaucageTetra(s)(1981).Lett., diethyl phosphorousaminodite method [of 22:1859-1862];, and the solid-state base material method of U.S. Pat. No. 4,458,066. It may be prepared by the suitable approach of arbitration which is indicated above. With one desirable operation gestalt, the nucleic acid which carries out the code of the glycosyltransferase may be isolated by the idiomatic cloning process. For example, the nucleotide sequence of a glycosyltransferase which is offered in GenBank or other array databases may be used in order to provide the glycosyltransferase mRNA in the glycosyltransferase gene in a genomic DNA sample, or the total RNA sample (for example, it can set to Southern blotting or a Northern blot) with the probe hybridized specifically. Once a target glycosyltransferase nucleic acid is identified, the standard approach that it is well-known to this contractor It Manual(s). for example, SambrookMolecular(s)(1989) Cloning:A Laboratory [] -- The 2nd edition, 1-3 volumes, Cold Spring Harbor Laboratory;Berger and Kimmel(1987) Methods in Enzymology, 152 volumes: Guide to Molecular Cloning Techniques, SanDiego:Academic Press, Inc., or Ausubel(s) (1987) CurrentProtocols in Molecular Biology and Greene Publishing and Wiley-Interscience, New It follows with reference to York and may be isolated.

[0057]

Cloning of the glycosyltransferase nucleic acid may be carried out by detecting the product discovered

THIS PAGE BLANK (USPTO)

by the assay based on a physical property, chemical property, or an immunological property again. For example, the glycosyltransferase nucleic acid by which cloning was carried out can be identified according to the capacity which carries out the catalyst of the shift of a monosaccharide to an acceptor part from the donor of the polypeptide by which a code is carried out with a nucleic acid. By the desirable approach, a resultant is detected using capillary electrophoresis. this high sensitivity assay -- Wakarchuk et al. (1996) -- it is related with using either of the aminophenyl derivatives of the monosaccharide by which an indicator is carried out using fluorescence which is indicated by J.Biol.Chem.271 (45):28271-276, or a disaccharide. For example, Neisseria In another side on which either FCHASE-AP-Lac or FCHASE-AP-Gal may be used in order to carry out assay of the lgtC enzyme, it is Neisseria. The suitable reagent for a lgtB enzyme is FCHASE-AP-GlcNAc (same as the above).

[0058]

As an alternative for carrying out cloning of the Glico transferase gene, chemosynthesis of the glycosyltransferase nucleic acid may be carried out from the well-known array which carries out the code of the glycosyltransferase. Chemosynthesis generates the standard oligonucleotide of a single strand. This may be converted into duplex deoxyribonucleic acid by the polymerization using the DNA polymerase which uses a single strand as a template by high buri die ZEJON using a complementary array. Although the chemosynthesis of DNA is often restricted to the array of about 100 bases, this contractor understands that a longer array may be acquired by connection of a shorter array.

[0059]

Or cloning of the partial array may be carried out, and a suitable partial array may be cut using a suitable restriction enzyme. Subsequently, fragmentation may be connected in order to generate a desired DNA array.

[0060]

With one operation gestalt, cloning of the glycosyltransferase nucleic acid may be carried out using the DNA magnification approach (for example, polymerase chain reaction (PCR)). It follows, for example, PCR magnification of a nucleic-acid array or the partial array is carried out using a sense primer including one restriction enzyme part (for example, NdeI), and an antisense primer including another restriction enzyme part (for example, HindIII). This generates the nucleic acid which carries out the code of a desired glycosyltransferase array or a desired partial array, and has an end restriction enzyme part. Subsequently, this nucleic acid may be easily connected into the vector containing the nucleic acid which carries out the code of the 2nd molecule, and has a suitable corresponding restriction enzyme part. A suitable PCR primer may be determined by this contractor using the array information offered in GenBank or other supply sources. A suitable restriction enzyme part may be added to the nucleic acid which carries out the code of the glycosyltransferase protein or the protein partial array by site-directed mutagenesis again. A plasmid including the nucleotide sequence or partial array which carries out the code of the glycosyltransferase is cut using suitable restriction endonuclease, and is connected into the suitable vector for the magnification and/or the manifestation according to an approach standard subsequently.

[0061]

Other physical properties of the polypeptide discovered from a specific nucleic acid may be compared with the property of a well-known glycosyltransferase in order to offer the option which identifies the nucleic acid which carries out the code of the glycosyltransferase. Or a presumed glycosyltransferase gene may vary and the role of a glycosyltransferase may be established by detecting the variation of the structure of the oligosaccharide usually produced by the glycosyltransferase.

[0062]

With some operation gestalten, to change the nucleic acid of a glycosyltransferase or an accessory enzyme may be wished. This contractor recognizes many approaches of generating the change in a predetermined nucleic-acid structure. Exposure to the mutagen or radiation containing PCR magnification using site-directed mutagenesis and a degeneracy oligonucleotide as the approach of such common knowledge and a nucleic acid of a cell, the chemosynthesis (combining with the ligation for,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

for example, generating a big nucleic acid and/or cloning) of a desired oligonucleotide, and the technique of other common knowledge are mentioned. For example, Gilman and Smith(1979) Gene 8:81-97 and Roberts(es) (1987) Nature Refer to 328:731-734.

[0063]

With a desirable operation gestalt, the recombination nucleic acid which exists in the cell of this invention is changed so that the desirable codon which increases a translation of the nucleic acid in the selected living thing may be included (for example, the desirable codon of yeast is permuted to the code nucleic acid for the manifestation in yeast).

[0064]

The glycosyltransferase of almost all arbitration may be used in the reaction mixture and approach of this invention. A suitable glycosyltransferase is chosen based on the product of the specific saccharide for which it asks. The following lists of glycosyltransferases are not limited although instantiation is meant.

[0065]

(a) Fucosyltransferase

With some operation gestalten, a glycosyltransferase is fucosyltransferase. Much fucosyltransferase is well-known to this contractor. Simply, as fucosyltransferase, either of these enzymes that shift L-fucose to the hydroxyl of acceptor sugar from GDP-fucose is mentioned. With some operation gestalten, acceptor sugar is GlcNAc in the Galbeta(1->4) GlcNAcbeta radical for example, in oligosaccharide glycoside. As suitable fucosyltransferase for this reaction Galbeta(3 1-> 4) GlcNAcbeta1-alpha (3 1-> 4) fucosyltransferase (FTIII E.C. number 2.4.1.65) (this) it characterized from human milk to the beginning (Palcic et al. and Carbohydrate Res.190:1-11 [;P] (1989) -- rieels et al. --) J. Biol.Chem.256:10456-10463(1981);, and Nunez et al., Refer to Can.J.Chem.59:2086-2095 (1981). And Galbeta(1->4) GlcNAc beta-alpha (1->3) fucosyltransferase (FTIV, FTV, FTVI and FTVII, E.C. number 2.4.1.65) (this is found out in a Homo sapiens blood serum) is mentioned. The recombination gestalt of Galbeta(3 1-> 4) GlcNAcbeta1-alpha (3 1-> 4) fucosyltransferase is also characterized (refer to Dumas et al., Bioorg.Med.Letters 1:425-428 (1991) and Kukowska-Latallo et al., and Genes and Development 4:1288-1303 (1990)). As other instantiation-fucosyltransferases, alpha 1 and 2 fucosyltransferase (E. C. number 2.4.1.69) is mentioned, for example. Enzyme-fucosyl-ization may be performed by the approach indicated by Mollicone et al., Eur.J.Biochem.191:169-176 (1990), or U.S. Pat. No. 5,374,655. The cell used in order to produce fucosyltransferase includes the enzyme system for compounding GDP-fucose again.

[0066]

(b) Galactosyltransferase

With another operation gestalt of a group, a glycosyltransferase is galactosyltransferase. When using galactosyltransferase, the cell containing an exogenous galactosyltransferase gene includes the enzyme system for compounding UDP-Gal again. In addition to a recombination cell, a reaction culture medium contains an oligosaccharide acceptor part and a divalent metal cation preferably. As instantiation-galactosyltransferase alpha (1 3) galactosyltransferase (E.) [C. number 2.4.1.151] For example, Dabkowski et al., Transplant Proc.25:2921 (1993), and Yamamoto et al., Nature 345:229-233 (1990), a cow (j04989, Joziase et al. [GenBank] (1989) J.Biol.Chem. 264:14290 -14297), A mouse (Larsen et al. [GenBank m26925;] (1989) Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 86:8227 -8231), Buta (Strahan et al. [GenBank L36152;] (1995) Immunogenetics 41:101 -105) -- referring to -- it is mentioned. Suitable alpha 1 [another] and 3 galactosyltransferase is alpha 1 and 3 galactosyltransferase (2.4.1.37, Yamamoto et al. [EC] (1990) J.Biol.Chem. 265:1146 -1151 (Homo sapiens)) which participates in composition of a B blood group antigen.

[0067]

moreover, as a suitable thing for the activity in the approach and recombination cell of this invention It is alpha (1 4) galactosyltransferase. As these EC 2.4.1.22 [for example,] (lactose synthetase) (a cow (D'Agostaro et al. (1989) Eur.J.Biochem. 183:211 -217) --) 2.4.1.90 (LacNAc synthetase) and EC Homo sapiens (Masri et al. (1988) Biochem.Biophys.Res.Comm. 157:657 -663), A mouse (Nakazawa et al.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1988) J.Biochem. 104:165 -168), E.C.2.4.1.38, and ceramide galactosyltransferase (E. C.2.4.1.45 and Stahl(s) (1994) J) Neurosci.Res.38:234-242 is mentioned. As other suitable galactosyltransferases, alpha 1 and 2 galactosyltransferase (for example, Schizosaccharomyces pombe, the ChapellMol(s) (1994).Biol.Cell 5:519 -528 origin) is mentioned, for example.

[0068]

(c) Sialyltransferase

A sialyltransferase is another mold of useful galactosyltransferase in the recombination cell and reaction mixture of this invention. The cell which produces a recombination sialyltransferase produces a CMP-sialic acid again, and this is a sialic-acid donor about a sialyltransferase. As an example of the suitable sialyltransferase for the activity in this invention ST3Gal III (for example, ST3Gal III of a rat or Homo sapiens), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II and ST6GalNAc an approach which is indicated by III (Tsuji et al. [The sialyltransferase nomenclature used in this description,] (1996) Glycobiology 6: v-xiv) -- it is -- it is mentioned. The instantiation-alpha (2 3) sialyltransferase called alpha (2 3) sialyltransferase (EC 2.4.99.6) shifts a sialic acid to the nonreduction end Gal of a Galbeta1 ->3Glc disaccharide or glycoside. Van den Refer to Eijnden et al., J.Biol.Chem., 256:3159 (1981), Weinstein et al., J.Biol.Chem., 257:13845 (1982) and Wen et al., J.Biol.Chem., and 267:21011 (1992). Instantiation alpha 2 [another] and 3-sialyltransferase (EC.2.4.99.4) shift a sialic acid to the nonreduction end Gal of a disaccharide or glycoside. Refer to Rearick et al., J.Biol.Chem., 254:4444 (1979) and Gillespie et al., J.Biol.Chem., and 267:21004 (1992). As further instantiation-enzyme, they are Gal-beta -1 and 4-GlcNAc. alpha-2 and 6 sialyltransferase (Kurosawa et al., Eur.J.Biochem.219:375-381 (1994)) is mentioned.

[0069]

(d) Other glycosyltransferases

Other glycosyltransferases which may be contained by the recombination host cell of this invention are indicated by the detail about a sialyltransferase, galactosyltransferase, and fucosyltransferase. In a detail, a glycosyltransferase again For example, glucosyltransferase Alg8 (Stagljov et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5977 (1994)) or Alg5 (Heesen et al. --) [for example,] Eur.J.Biochem.224:71 (1994) For example, alpha(1 3) N-acetyl galactosaminyl transferase, beta(1 4) N-acetyl galactosaminyl transferase (Nagata et al. --) J. Biol.Chem.267:12082-12089 (1992), and Smith et al., J. -- Biol.Chem.269:15162 (1994) and polypeptide N-acetyl galactosaminyl transferase (Homa et al. --) J. It may be N-acetyl galactosaminyl transferase like Biol.Chem.268:12609 (1993). As a suitable N-acetyl GURUKOSAMI nil transferase GnTI (2.4.1.101, Hull et al., and BBRC 176:608 (1991) --) GnTII and GnTIII (Ihara et al., J.Biochem.113:692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al., J.Biol.Chem.268:15391 (1993)), an O-connection N-acetyl GURUKOSAMI nil transferase (Bierhuizen et al. --) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:9326 (1992), An N-acetyl glucosamine-1-phosphoric-acid transferase (Rajput et al., Biochem J.285:985 (1992)) and HIARURONAN synthase are mentioned. As suitable mannosyotransferase, alpha (1 2) mannosyotransferase, alpha (1 3) mannosyotransferase, beta (1 4) mannosyotransferase, Dol-P-Man synthase, and Och1 and Pmt1 are mentioned.

[0070]

The glucosyltransferase of a procaryote is useful in the recombination cell and reaction mixture of this invention again. The enzyme which participates in composition of RIPOORIGO sugar (LOS) is mentioned to such glucosyltransferase, and this enzyme is produced by many Gram negative bacterium. This LOS has the end glycan array which copies typically the glycoconjugate found out on a human epithelial cell or in host secrete (Preston et al. (1996) Critical Reviews in Microbiology 23 (3) : 139 - 180). In such an enzyme, they are E.coli and Salmonella. Although the protein of the rfa operon of a kind like typhimurium is mentioned, it is not limited to these. In these enzymes, beta 1 and 6 galactosyltransferase and beta 1, 3 galactosyltransferase (For example, refer to the EMBL registration number M80599 and the M86935(E. coli);EMBL registration number S56361 (S. typhimurium)) Glucosyltransferase (Swiss-Prot registration number P25740 (E. coli)), 2-glucosyl truss FERAZE (rgaJ) (the Swiss-Prot registration number P27129 (E. coli) and Swiss-Prot registration number P19817 (S. typhimurium)) beta 1 -- And beta 1, a 2-N-acetyl GURUKOSAMIMI nil transferase (rfaK) (the EMBL

THIS PAGE BLANK (USPTO)

registration number U00039 (*E. coli*) is mentioned.) Other glucosyltransferases with a well-known amino acid sequence are the operon like *rfaB* (this is characterized in an organism like *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, and *Mycobacterium leprosum*), and *Pseudomonas*. The array in which a code is carried out by the *rhl* operon of *aeruginosa* is included.

[0071]

Moreover, RAKUTO-N-neo tetrapod OSU (neotetraose), The D-galactosyl - beta-1, 4-N-acetyl-D-galactosyl - beta-1, the 3-D-galactosyl - beta-1, a 4-D-glucose, And the glucosyltransferase which participates in producing the structure containing the array of Pk blood-group Tori sugar, the D-galactosyl - alpha-1, the 4-D-galactosyl - beta-1, and a 4-D-glucose Are suitable in order to use it in the cell of this invention. These Mucosal-diseases original object *Neisseria* It is identified in LOS of gonorrhoeae and *N. meningitidis* (Scholten et al. (1994) *J. Med. Microbiol.* 41:236 -243). It is identified from the *N. meningitidis* immunity molds L3 and L1 (Jennings et al. (1995) *Mol. Microbiol.* 18:729 -740), and *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae* which carry out the code of the glycosyltransferase which participates in the biosynthesis of these structures are the *N. gonorrhoeae* variant F62 (Gotshlich (1994) *J. Exp. Med.* 180:2181-2190). *N. meningitidis*, the locus which consists of three sorts of genes (*lgtA*, *lgt* and *lgtE*) carries out the code of the glucosyltransferase enzyme needed for the last three sugar in a RAKUTO-N-neo tetrapod OSU chain (Wakarchuk et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:19166 -73). Recently, ***** of *lgtB* and a *lgtA* gene product is proved, and these offer the 1st direct evidence about these advocated glucosyltransferase functions (Wakarchuk et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:19171 -276). *N. meningitidis*, two sorts of further genes, *lgtD* and *lgtC*, exist, and *lgtD* adds beta-D-GalNac to the 3rd place of the end galactose of the RAKUTO-N-neo tetrapod OSU structure, and *lgtC* adds the lactose element of the compaction mold LOS for end alpha-D-Gal -- this forms Pk blood group group-antigens structure (Gotshlich (1994) above). *N. meningitidis*, it is shown that the separation immunity mold L1 has a *lgtC* gene by discovering Pk blood group antigen again (Jennings et al. (1995) above). *Neisseria* glucosyltransferase and the gene of the relation are indicated by USP5,545,553 (Gotshlich) again. *Helicobacter alpha 1*, 3-fucosyltransferase, and the gene of the pylori origin are also characterized (Martin et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:21349 -21356).

[0072]

(e sulfotransferase)

This invention offers the approach for producing a recombination cell, a reaction mixture, and a sulfation molecule again, and heparin, a heparan sulfate, Carrageenan (carragenen), and a related compound are mentioned to this sulfation molecule. In these operation gestalten, the reaction mixture of this invention contains the recombination cell containing at least one heterologous gene which carries out the code of the sulfotransferase. Such a cell produces an active sulfate-ized agent like 3'-phospho adenosine-5'-phospho sulfate (PAPS) again. The gene of the cell which can sulfurate an oligosaccharide or a polysaccharide is offered by including one or more sulfotransferase genes in the cell which produces PAPS again by either which is nature or minds addition of a PAPS cycle playback enzyme (drawing 11). In the suitable sulfotransferase, for example, the chondroitin-6-sulfotransferase (Fukuta et al. (1995) the fowl cDNA given in the *J. Biol. Chem.* 270:18575-18580; GenBank registration number D49915), Glycosaminoglycan N-acetyl glucosamine N-DEASECHIRAZE / N-sulfotransferase 1 (Dixon Genomics(es) (1995) 26:239-241; UL18918), And glycosaminoglycan N-acetyl glucosamine N-DEASECHIRAZE / N-sulfotransferase 2 (it reaches Orellana J (1994) *Biol. Chem.* 269:2270-2276) [Eriksson] (1994) *Homo sapiens* cDNA of a publication is mentioned to the cDNA; GenBank registration number U2304 of a mouse given in *J. Biol. Chem.* 269:10438-10443.

[0073]

(2. Attached enzyme which participates in composition of nucleotidyl sugar and other reactants)

A glucosyltransferase reaction needs the nucleotidyl sugar which acts as a sugar donor. In some operation gestalten, the recombination cell of this invention can produce the sugar nucleotide which acts as a sugar donor for the glucosyltransferase which is nature and is produced by the cell, and the nucleotide to which the sugar molecule adheres (for example, refer to drawing 1 A). However, some

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cells are nature, and in order to produce the saccharide which is the product of a desired amount, they do not produce sufficient quantity of a nucleotide, either of the nucleotidyl sugar, or those both. In such a situation, the recombination cell of this invention contains not only the heterologous gene of glucosyltransferase but at least one heterologous gene which carries out the code of the attached enzyme (for example, refer to drawing 1 B).

[0074]

An attached enzyme contains the enzyme which participates in formation of nucleotidyl sugar. For example, it can participate in being able to participate in an attached enzyme adhering sugar to a nucleotide, or producing sugar or a nucleotide. Since an organism produces either a nucleotide or a sugar nucleotide continuously and a recombination enzyme also exists, continuous production of a product leaves the raw material of low cost, and may be caused. Recycle of the used nucleotide produced from the rearrangement of the sugar of the sugar nucleotide origin may also be caused during formation of a product. The organism is because an enzyme process is included in order to change either a sugar nucleotide or a nucleotide. The attached enzyme which participates in composition of nucleotidyl sugar is common knowledge at this contractor. About the outline of composition of a bacterial polysaccharide, and the nomenclature of a gene, they are Reeves et al. and Trends. Refer to Microbiol.4:495-503 (1996).

[0075]

In a current desirable operation gestalt, the enzyme system for forming nucleotidyl sugar contains the enzyme in which a code is carried out by the heterologous gene. Such a cell offers the means for forming desired nucleotidyl sugar which is not produced by the cell of a wild type or is not usually intentionally produced by the cell of a wild type with a high level. In some examples, the enzyme in which a code is carried out by the heterologous gene may convert the nucleotide or nucleotidyl sugar produced by the cell into different nucleotidyl sugar which can act as a substrate for a desired ligation reaction. The enzyme in which a code is carried out by the heterologous gene in other cases is autogenous, or is either as a result of the substrate added to the cell, and can compound nucleotidyl sugar from other substrates (for example, nucleotide) found out by the cell. Composition and/or the shift reaction of two or more nucleotidyl sugar may be attained by using the cell containing the heterologous gene exceeding 1 which carries out the code of the enzyme which participates in composition of nucleotidyl sugar.

[0076]

The gene which carries out the code of the enzyme for the whole sugar nucleotide regenerative cycle may be introduced into an organism with the target glucosyltransferase. Therefore, the recombination cell obtained can produce both desired nucleotidyl sugar and a desired product (drawing 8 A and drawing 8 B). The path and enzyme which participate in composition of nucleotidyl sugar are common knowledge at this contractor. About the outline of composition of a bacterial polysaccharide, and the nomenclature of a gene, they are Reeves et al. and Trends. Refer to Microbiol.4:495-503 (1996). The examples of the cycle enzyme used for production of various nucleotidyl sugar are enumerated by the table 1.

[0077]

Table 1. Each of a cycle process enumerated by 11 or less cycle enzyme needs either of the enzymes needed for reproducing the supply source or nucleotide of nucleotide triphosphoric acid in a nucleotide triphosphoric acid gestalt.

[0078]

[Formula 1]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

GlcNAc サイクル

UDP-GlcNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc/GalNAc キナーゼ

GlcNAc トランスフェラーゼ

Gal サイクル-1

Gal キナーゼ

UDP-Gal ビロホスホリラーゼ

Gal トランスフェラーゼ

Gal サイクル-2

UDP-Gal 4'-エピメラーゼ

UDP-Glc ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ キナーゼ

ホスホリルコムターゼ

ST サイクルST 融合 (シアリルトランスフェラーゼ融合 CMP-SA
シンターゼ)*

*(またはシアリルトランスフェラーゼおよび CMP-SA シンターゼ)

NeuAc アルドラーゼ

GlcNAc エピメラーゼ

Fuc サイクル-1

GDP-Fuc エピメラーゼ/リターターゼ

GDP-Fuc アルドラーゼ

GDP-Man ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ

ホスホマンノムターゼ

7コシルトランスフェラーゼ

GalNAc サイクル-1

UDP-GalNAc エピメラーゼ

UDP-GlcNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc 1-ホスホキナーゼ*

*(または 1キリキナーゼおよび GlcNAc
ホスホムターゼ)

GlcNAc トランスフェラーゼ

GalNAc サイクル-

UDP-GalNAc ビロホスホリラーゼ

GlcNAc トランスフェラーゼ

GlcNAc/GalNAc キナーゼ

Man サイクル

GDP-Man ビロホスホリラーゼ

1キリキナーゼ

ホスホマンノムターゼ

Man トランスフェラーゼ

Fuc サイクル-2

GDP-Fuc ビロホスホリラーゼ

7コ-ス1-ホスホキナーゼ

7コシルトランスフェラーゼ

One or more paths of participating in the product of nucleotidyl sugar can be changed by introducing into the cell containing the substrate for an attached enzyme the nucleic acid which carries out the code of the attached enzyme. The above-mentioned approach for obtaining a glucosyltransferase code nucleic acid is also applicable to obtaining the nucleic acid which carries out the code of the enzyme which participates in formation of nucleotidyl sugar. For example, a nucleic acid well-known as a probe for isolating the nucleic acid which can use a well-known nucleic acid (these some are indicated in this description) directly in the field concerned, or corresponds from other target organisms can be used. Isolation of the polynucleotide which carries out the code of the nucleotidyl sugar synthetic enzyme may be carried out by this contractor with two or more well-known techniques. For example, the oligonucleotide probe which hybridizes the specific gene of a publication selectively in this description may be used in order to identify the gene of the request of DNA isolated from another organism. In addition, the activity of such a hybridization technique for identifying a well-known homologous gene in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the field concerned is as being indicated above.

[0079]

(Playback of a UDP-Gal)

A different-species galactosyltransferase gene is mentioned as the example of instantiation-of a recombination cell useful although the saccharide of a galactosyl-ized product is produced. However, generally galactosyltransferase uses activation nucleotidyl sugar UDP-Gal comparatively expensive as a galactose donor. In order to decrease the costs concerning this reaction, one or more genes which carry out the code of the enzyme which participates in the biosynthetic path led to UDP-Gal, or carries out the catalyst of the changeover of UDP-Gal to the molecule which is not nucleotidyl sugar to a cell can be introduced (or the level of that gene expression is raised).

[0080]

For example, glucokinase (EC2.7.1.12) carries out the catalyst of the phosphorylation of a glucose, and forms Glc-6-P. The gene (for example, E.coli:GenBank AE000497 U00096, BlattnerScience(s)(1997) 277:1453- 1474;Bacillus subtilis;GenBank Z99124, AL009126, Kunst-256 [Nature / 390 and 249] (1997)) which carries out the code of the glucokinase is characterized, therefore may be easily obtained from many organisms by hybridization or magnification. Therefore, the recombination cell containing this gene and the enzyme of the consecutiveness in the above-mentioned path can form a GDP-glucose from an available glucose easily that it may be whether it may be produced with an organism, or added to a reaction mixture.

[0081]

The catalyst of the following process in the path led to UDP-Gal is carried out by the phosphoglucumutase (EC 5.4.2.2) which converts Glc-6-P into Glc-1-P. Furthermore, the gene which carries out the code of this gene is also characterized with the organism of the broad range. Agrobacterium tumefaciens:GenBank AF033856, Uttaro et al. [for example,] -- Gene150:117-122 (1994) [the correction exhibited in Gene (1995) 155:141-3 is indicated];Entamoeba histolytica:GeneBank Y14444, Ortner et al., Mol.Biochem.Parasitol.90,121-129 (1997);Mesembryanthemum crystallinum:GenBank U84888;S.cerevisiae;GenBank X72016, U09499, X74823, Boles et al., Eur.J.Btochem.220:83-94 (1994), Fu et al., J.Bacteriol.177(11), 3087-3094 (1995); Homo sapiens:GenBank M83088 (PGM1), Whitehouse et al., Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.89:411-415 (1992), Xanthomonas compestris:GenBank M83231, Koeplin et al., J. Bacteriol.174:191-199 (1992);Acetobacter xylinum:GenBank L24077, Brautaset et al., Microbiology 140 (Pt5) 1183-1188 (1994);Neisseria meningitidis:GenBank U02490, Zhou et al., J. Biol.Chem.269(15), 11162-11169 (1994).

[0082]

UDP glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9) carries out the catalyst of the following process in this path, and converts Glc-1-P into UDP-Glc. The gene which carries out the code of the UDP-Glc pyrophosphorylase many organisms are indicated (E.coli:GenBank M98830, Weissborn et al. [for example,] --) J. Bacteriol.176:2611-2618(1994);Cricetulus griseus:GenBank AF004368, Flores-Diaz et al., J. Biol.Chem.272:23784-23791(1997);Acetobacter xylinum:GenBank M76548, Brede et al., J. Bacteriol.173, 7042-7045 (1991);Pseudomonas aeruginosa(galU):GenBank AJ010734, U03751;Streptococcus pneumoniae:GenBank AJ004869;Bacillus subtilis:Genbank Z22516 and L12272; -- Soldo et al. and J.Gen.Microbiol.139 (Pt12) -- 3185-3195(1993);Solanum tuberosum:GenBank U20345, L77092, L77094, L77095, L77096, L77098, U59182, Katsube et al., J. Biochem.108:321-326 (1990);Hordeum vulgare(barley):GenBank X91347;Shigella flexneri:GenBank L32811, Sandlin et al., Infect.Immun.63:229-237(1995); Homo sapiens: -- GenBank U27460, Duggleby et al. -- Eur.J.Biochem.235 (1-2), 173-179 (1996); cow:GenBank L14019, Konishi et al., J.Biolchem.114, 61-68 (1993).

[0083]

UDP-Glc4'-epimerase (UDP-Gal4' epimerase; EC5.1.3.2) carries out the catalyst of the changeover to UDP-Glc of UDP-Glc to the last. Streptococcus indicated by Poolman and others (J. Bacteriol 172:4037-4047 (1990)) thermophilus A UDP galactose 4-epimerase gene is the specific example of a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

useful gene in this invention. The UDP glucose 4-epimerase-code polynucleotide of other organisms may be used in this invention, as long as a polynucleotide is under control of the manifestation control array which functions by the host cell of *E.coli* or other requests. The kind of *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.lividans*, *stewartii*, *Salmonella*, and *E.Streptococcus* is mentioned to the instantiation-organism which has the gene which carries out the code of the UDP glucose 4-epimerase. Well-known a nucleotide sequence -- UDP-Glu4'-epimerase ***** of some organism origins -- to these *Pasteurella haemolytica*, GenBank U39043, Potter et al., *Infect.Immun.*64(3)855-860(1996); *Yersinia enterocolitica*, GenBank Z47767, X63827, Shurnik et al., *Mol.Microbiol.*17:575-594(1995); *Cyamopsis tetragonoloba*:GenBank AJ005082 ; *P. achysolen tennophilus*:GenBank X68593, Skrzypek et al., *Gene*140(1)127-129 (1994); *Azospirillum brasilense*:GenBank Z25478, De Troch et al., *Gene* 144 (1), 143-144 (1994); *Arabidopsis thaliana*:GenBank Z54214, Dormann et al. -- *Arch.Biochem.Biophys.*327:27-34 (1996); *Bacillus subtilis*:GenBank X99339, Schrogel et al. -- *FEMS Microbiol.Lett.*145:341-348 (1996); *Rhizobium meliloti*:GenBank X58126, S81948, Buendia et al., *Mol.Biol.*5:1519-1530 (1991); *Rhizobium leguminosarum*:GenBank X96507; *Erwinia amylovora*:GenBank X76172, Metzger et al., *J. Bacteriol.*176:450-459(1994); *S.cerevisiae*:GenBank X81324 (cluster of epimerase and UDP glucose pyrophosphorylase), Schaaff-Gerstenschlager, *Yeast* 11:79-83(1995); *Neisseria meningitidis*:GenBank U19895, L20495, Lee et al., *Infect.Immun.*63:2508-2515 (1995), Jennings et al., and *Mol.Microbiol.*10:361-369(1993); and *Pisum sativum*:GenBank U31544 is mentioned.

[0084]

The gene which carries out the code of the enzyme which constitutes the path which often participates in compounding nucleotidyl sugar is found out by the single operon or the field of Chromosome DNA. For example, *Xanthomonas* The gene of the *campestris* phosphoglucomutase, phospho MANNO mutase (*xanA*), phosphomannose isomerase, and GDP mannose pyrophosphorylase (*xanB*) is found out by single continuation nucleic-acid fragmentation (Koeplin et al., *J.Bacteriol.*174, 191-199 (1992)). *Klebsiella pneumoniae* galactokinase, galactose-1-phosphateuridyltransferase, and UDP-galactose 4'-epimerase are also found out in the single operon (Peng et al. (1992) *J.Biochem.* 112:604 -608). Many of other examples are indicated by the reference quoted in this description.

[0085]

The approach of the alternative which constitutes the cell which produces UDP-Gal is introducing into a cell the gene which carries out the code of the enzyme which participates in the UDP-Gal cycle shown in drawing 4 . Starting this path from UDP-Gal pyrophosphorylase (galactose-1-phosphateuridyltransferase), this enzyme converts Gal-1-P into UDP-Gal. The gene which carries out the code of the UDP-Gal pyrophosphorylase It has characterized about some organisms. To these For example, *Rattus norvegicus*:GenBank L05541, Heidenreich et al., DNA AF005933 (galactokinase (*galK*) --) Seg.3:311-318(1993); *Lactobacillus casei*:GenBank The cluster of UDP galactose 4-epimerase (*galE*) and galactose-1-phosphateuridyltransferase (*galT*), Bettenbrock et al., *Appl.Environ.Microbiol.*64:2013-2019(1998); *E.coli*:GenBank X06226 (and a galactose-1-P uridine transferase pair is carried out UDP galactose 4-epimerase --) *galE* and *galT*, Lemaire et al., *Nucleic Acids Res.*14:7705-7711(1986); *B.subtilis*:GenBank Z99123 AL009126; *Neisseria gonorrhoeae*:GenBank Z50023, Ullrich et al., and *J.Bacteriol.*177:6902-6909(1995); *Haemophilus* X65934 (galactose-1-phosphateuridyltransferase --) *influenzae*:GenBank Galactokinase, a mutarotase, and the cluster of galactose repressor, Maskell et al., *Mol.Microbiol.*6:3051-3063 (1992), GenBank M12348 and M12999, Tajima et al., *Yeast*1:67-77(1985); *S.cerevisiae*:GenBank X81324, Schaaff-Gerstenschlager et al., *Yeast*11:79-83(1995); *Mus musculus*:GenBank U41282; *Homo sapiens*: -- GenBank M96264, M18731, Leslie et al. -- *Genomics* 14:474-480 (1992), Reichardt et al., *Mol.Biol.Med.*5:107-122(1988); *Streptomyces lividans*:M18953 (a galactose 1-phosphate uridine transferase --) UDP-galactose 4-epimerase and galactokinase, Adams et al., and *J.Bacteriol.*170:203-212 (1988) are mentioned.

[0086]

UDP-GlcNAc4' epimerase (UDP-GalNAc4'-epimerase) (EC5.1.3.7) (this carries out the catalyst of the changeover to UDP-GalNAc of UDP-GlcNAc and the reverse reaction) is suitable for an activity in the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

recombination cell of this invention again. Some loci which carry out the code of this enzyme are described above. Also refer to U.S. Pat. No. 5,516,665.

[0087]

(Playback of b GDP-fucose)

Another example of the recombination cell offered by this invention is used in order to produce the saccharide which is a fucosyl-ized product. The donor nucleotidyl sugar about fucosyltransferase is GDP-fucose, and this is comparatively expensive although produced. In some operation gestalten of this invention, the costs for obtaining GDP-fucose decrease by introducing into a recombination cell one or more exogenous genes which carry out the code of the enzyme which carries out the catalyst of the GDP-fucose cycle.

[0088]

In order to decrease the costs which produce a fucosyl-ized oligosaccharide, this invention offers the cell which may convert comparatively cheap GDP mannose into GDP-fucose. These cells are GDP mannose dehydratase, the GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose 3, 5-epimerase, or GDP-4. - It has at least one exogenous gene which carries out the code of the keto-6-deoxy-L-glucose 4-reductase. The cell which has each of such enzyme activity may convert GDP mannose into GDP-fucose. By installation to this cell of fucosyltransferase, the cell which can fucosyl-ize an oligosaccharide acceptor as donor activation sugar not using GDP-fucose but using GDP mannose is obtained.

[0089]

The nucleotide sequence of the E.coli gene cluster which carries out the code of the GDP-fucose synthetic enzyme is indicated by the StevensonJ(1996).Bacteriol.178:4885-4893;GenBank registration number U38473. It is reported that this gene cluster contains the open reading frame to GDP mannose dehydratase (nucleotide 8633- 9754; Stenvenson et al., the above). It is recently discovered that the open reading frame to which this gene carries out the code of the enzyme which has both 3, 5 epimerization, and 4-reductase activity again is included (refer to the PCT patent application number USs 99/00893 (opened to the public as WO 99/36555 on July 22, 1999)), therefore it may convert the product of a GDP mannose dehydratase (GDP-4-keto-6-deoxymannose) reaction into GDP-fucose. This ORF (named YEF B) is found out among nucleotides 9757 and 10722. YEF It was not well-known whether before this discovery of carrying out the code of the enzyme with which B has the activity of two ones of numbers, 1 or two enzymes were needed for changeover to the GDP-fucose of GDP-4-keto-6-deoxymannose. The nucleotide sequence of the gene which carries out the code of the Homo sapiens Fx enzyme is found out by the GenBank registration U58766.

[0090]

A recombination cell may contain the gene which carries out the code of the pyrophosphorylase (EC2.7.7.22) which converts Man-1-P into GDP-Man again. When it exists with an enzyme like the above-mentioned thing which carries out the catalyst of the changeover of GDP-Fuc of GDP-Man, such ***** leaves comparatively cheap Man-1-P, and can compound GDP-Fuc. A suitable gene is well-known from many organisms. To these E. coli:GenBank U13629, AB010294, D43637, D13231, Bastinra, Gene 164:17-23 (1995), Sugiyama et al., J. Bacteriol.180:2775-2778 (1998), Sugiyama et al., Microbiology 140 (Ptl):59-71 (1994), Kido et al., J.Bacteriol.177:2178-2187(1995);Klebsiella pneumoniae:GenBank AB010296, AB010295, Sugiyama et al., J. Bacteriol.180:2775-2778 (1998);Salmonellaenterica:GenBank X56793, M29713, Stevenson et al., J. Bacteriol.178:4885-4893 (1996) is mentioned.

[0091]

The cell of this invention for fucosyl-izing a saccharide acceptor can use the enzyme which offers the minor path for formation of GDP-fucose, or "prehension" path again (shown in reference). In this path, phosphorylation is carried out by FUKOKINAZE and isolation fucose forms fucose 1-phosphate by it. This fucose 1-phosphate is used in GDP-fucose pyrophosphorylase with guanosine 5'-3 phosphoric acid (GTP), and forms GDP-fucose (Ginsburg et al., J.Biol.Chem.236:2389-2393 (1961) and Reitman, J.Biol.Chem.255;9900-9906 (1980)). A GDP-fucose pyrophosphorylase code nucleic acid is indicated by the United States patent application 08th transferred to the same people under simultaneous

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0092]

In order to obtain the recombination cell of useful this invention at a sialyl-ized reaction, the gene which carries out the code of the enzyme which carries out the code of the CMP-sialic-acid synthetase (EC2.7.7.43, CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase) can be introduced. Such a gene is available from the following.

[0093]

[Equation 1]

(Enzyme besides d)

[0094]

[Equation 2]

(Destruction of the alternate route for consumption of e nucleotidyl sugar)

1/26/2006

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Man which is not used for composition of alginate any longer is diverted to composition of a desired MANNOSHIRU-ized oligosaccharide. Or the gene which carries out the code of the one or more above enzymes which convert GDP-Man into different activation sugar (for example, GDP-Fuc) can be introduced. Subsequently, it rearranges, and since [which produces the target fucosyl-ized oligosaccharide] it was obtained, a cell may be used.

[0095]

Similarly, utilization of UDP-GlcNAc can constitute the recombination cell which diverts composition of peptidoglycan to a desired GluNAc-content oligosaccharide. For example, in E.coli, six sorts of a series of enzymes which carry out a sequential operation participate in changeover to the precursor of the peptidoglycan of UDP-GluNAc (Mengin-Leereulx et al. (1983) J.Bact. 154:1284 -1290). UDP-GlcNAc of the large quantity produced by the cell can be diverted to the product of a desired GluNAc content oligosaccharide destroying one of the enzymes of these (preferably the 1st operation enzyme), and by introducing a GluNAc transferase into a cell. Or UDP-GlcNAc may be converted into UDP-GalNAc by installation of the gene which carries out the code of the UDP-GlcNAc4'-epimerase, and, subsequently to a cell, this UDP-GalNAc can be helpful as a sugar donor for the UDP-GalNAc transferase in which a code is carried out by the exogenous gene introduced again.

[0096]

Escherichia which contains E.coli as another example sp. can produce a film joint Pori sialic acid. The variant by which composition of the Pori sialic acid is destroyed accumulates a CMP-sialic acid (Gonzalez-Clemente et al. [Vimr and Troy(1985) J.Bact.164;854- 860;] (1990) Biol.Chem. 371:1101 - 1106; ChoProc(s)(1994).Nat'l.Acad.Sci.USA 91:11427-11431). The recombination cell which can produce the saccharide which is the sialyl-ized product of a large quantity by introducing a sialyltransferase gene into these variants is obtained. This exogenous polysaccharide cholanoic acid (colanic acid) uses GDP-fucose as a precursor, and is produced by E.coli again. Therefore, the activity of the enzyme which participates in changeover to the cholanoic acid of GDP-fucose can be destroyed (GDP-Man4, 6-dehydratase;Stevenson et al. [for example,] (1996) J.Bacteriol. 178:4885 -4893).

[0097]

Azorhizobium, Bradyrhizobium, Rhizobium, and the bacteria belonging to a Sinorhizobium group can produce a RIPOKITO oligosaccharide (LCO). The code of the fucosyltransferase which uses GDP-fucose as a donor for converting [in / at least / some] fucose into a LCO precursor of these groups is carried out (Mergaert et al. (1997) FEBS Lett. 409:312 -316). Therefore, the GDP-fucose produced by this cell can be diverted to other applications by destroying the activity of this fucosyltransferase. For example, the recombination cell which a different fucosyltransferase gene may be introduced into this cell, thus produces a desired fucosyl-ized saccharide is obtained.

[0098]

The following is mentioned as other examples of the organism which can be diverted to production of the saccharide of the request by destruction of polymer composition, and related nucleotidyl sugar. :

[0099]

[Equation 3]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Azotobacter vinelandii/GDP-Man; *Pseudomonas sp.*/UDP-Glc and GDP-Man; *Rhizobium sp.*/UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man; *Erwinia sp.*/UDP-Gal, UDP-Glc; *Escherichia sp.*/UDP-GlcNAc, UDP-Gal, CMP-NeuAc, GDP-Fuc; *Klebsiella sp.*/UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-GlcNAc (たとえば Hamadeh ん (1996) *Infect. Immun.* 64: 528-534); *Hansenula jadinii*/GDP-Man, GDP-Fuc; *Candida famata*/UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc (Ko ん (1996) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60: 41-48); *Acetobacter xylinum*/GDP-Man (Petroni ん (1996) *J. Bacteriol.* 178: 4814-4121) 及び *Saccharomyces cerevisiae*/UDP-Glc, UDP-Gal, GDP-Man, GDP-GlcNAc.

The approach of introducing a variant into a target gene is common knowledge, and is indicated by this contractor at Ausubel, Sambrook, and Berger (it appears above altogether).

[0100]

In some operation gestalten, the recombination cell of this invention can produce two or more nucleotidyl sugar or nucleotides, and thereby, in order to produce a target's sugar, it enables installation of two or more glucosyltransferases with two or more glycosyltransferases or cycle enzymes to support, respectively. This enables production of two or more glycoside linkages in the product which uses a single organism. For example, when an organism produces both UDP-Gal and UDP-GlcNAc, two new glycosidic linkage production is enabled from the same organism by addition of a Gal transferase and a GlcNAc transferase (drawing 2). When an organism produces UTP of high level as another example, two new glycoside linkages may be formed from a single organism by adding the gene which carries out the code of the gene which carries out the code of the enzyme for production of UDP-Gal and UDP-GlcNAc, a Gal-transferase, and the GlcNAc transferase. In these examples, when this transferase makes the polymerization of glycoside possible, a long-chain oligosaccharide and a long-chain polysaccharide may be formed.

[0101]

(3. Fusion protein)

In some operation gestalten, the recombination cell of this invention discovers the fusion protein which has the enzyme activity exceeding 1 which participates in composition of a desired oligosaccharide. This fusion polypeptide may consist of catalyst domains of the glucosyltransferase combined with the catalyst domain of for example, an attached enzyme. The catalyst domain of an attached enzyme can carry out the catalyst of the reaction which carries out the catalyst of the process in formation of the nucleotidyl sugar which is a donor for glucosyltransferase, or participates in glucosyltransferase. For example, the polynucleotide which carries out the code of the glucosyltransferase may be combined with an in frame in the polynucleotide which carries out the code of the enzyme which participates in nucleotidyl sugar composition. Subsequently, the fusion protein obtained can carry out the catalyst not only of composition of nucleotidyl sugar but the transition to the acceptor molecule like a sugar part. This fusion protein may be two or more cycle enzymes connected with the nucleotide sequence in which one manifestation is possible. The polypeptide of this invention uses well-known various recombinant DNA technology for this contractor, and may be designed and manufactured easily. Suitable fusion protein is indicated by PCT patent application PCT/CA 98/01180 published as WO 99/31224 on June 24, 1999.

[0102]

(4. Construction of a recombination cell)

The recombination cell of this invention contains the enzyme system for producing the nucleotidyl sugar which is a donor substrate for the exogenous gene which carries out the code of the glucosyltransferase

THIS PAGE BLANK (USPTO)

which carries out the catalyst of the desired glycosylation reaction, and glucosyltransferase, and an exogenous saccharide acceptor part. Glucosyltransferase carries out the catalyst of the transition of sugar from nucleotidyl sugar to an acceptor part, and produces a desired oligosaccharide.

[0103]

In some operation gestalten, the enzyme system for production of nucleotidyl sugar is changed by the approach of rearranging again. For example, this enzyme system may contain one or more enzymes changed since a code is carried out to a cell by the gene which is exogenism or production of nucleotidyl sugar is increased as mentioned above.

[0104]

The enzyme which participates in composition of the polynucleotide or nucleotidyl sugar which carries out the code of the exogenous glycosyltransferase typically is put under control of the promotor who is functionality in a desired host cell. Very broad various promotors are common knowledge, and it may be used for the vector of this invention depending on specific application. Usually, the promotor chosen is dependent on the cell by which this promotor should be activated. about other manifestation control arrays like [like a ribosome bond part], and the termination section of an imprint -- etc. -- it is contained if needed. The suitable manifestation control array for the activity of a specific host cell is acquired by often carrying out cloning of the gene discovered in a cell. The recombination cell of this invention may be a microorganism like for example, a plant cell or a yeast cell, a bacterial cell, or a fungus cell. It is in many of other cells, for example, is Azotobacter in the example of a suitable cell. sp. (for example, *A.vinelandii*), *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Erwinia* sp., *Escherichia* sp. (for example, *E.coli*) and *Klebsiella* sp. is mentioned. This cell may be some groups of arbitration. To these *A.Saccharomyces* (for example, *S.cerevisiae*), *Candida* *It krusei*(s). for example, *C.utilis*, *C.parapsilosis*, and *C. -- C. versatilis*, *C.lipolytica*, *C.zeylanoides*, *C. guilliermondii*, *C.albicans*, and *C.humicola*, The *Pichia* (*Pichia*) group (for example, *P.farinosa* and *P.ohmeri*), the *Torulopsis* (it *sphaerica*(s) for example, *T.candida* and *T. --*) *T. xylinus*, *T.famata*, and *T.cersatilis*, the *Debaryomyces* (*Debaryomyces*) group (it *subglobosus*(es) for example, *D. --*) *D. cantarellii*, *D.globosus*, *D.hansenii*, And *D.japonicus*, a *JIGOSAKKAROMISESU* (*Zygosaccharomyces*) group For example, (*Z.rouxii* and *Z.bailii*), the *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces*) group (For example, *Kmarxianus*), the *Hansenula* (*Hansenula*) group For example, (*H.anomala* and *H.jadinii*), a *BURETANO* married-woman (*Brettanomyces*) group (for example, *B.lambicus* and *B.anomalus*), and tobacco are mentioned.

[0105]

A promotor and other control signals may be the different-species promotor or other signals which are obtained from a gene which may be the gene origin which is under examination, or is different, or a different kind. When asking for the continuation manifestation of a gene, generally the "configuration target" promotor who is activity can be used under almost all environmental conditions and an occurrence, or the condition of differentiation of a cell. In the suitable configuration-promotor for an activity with vegetation, they are for example, a cauliflower mosaic virus (*CaMV*) 35S imprint initiation field and VI promoterregion, and *Agrobacterium*. Other promotors who are activity are mentioned in a plant cell well-known to the 1' - or 2'-promotor and this contractor of the T-DNA origin of *tumefaciens*. A Figwort mosaic virus, an actin promotor, a histone promotor, a tubulin promotor, or the transcriptional promotor of the perfect length of the *MANNOPIN* (*mannopine*) synthase promotor (*MAS*) origin is mentioned to other suitable promotors. Other imprint initiation fields of the various vegetable gene origins well-known to the promotor (indicated by U.S. Pat. No. 5,106,739 and Comai et al., and *Plant Mol.Biol.*15:373-381 (1990)) and this contractor of the promotor of the various ubiquitins of the *Arabidopsis* (Sun and Callis, *Plant J.*, 11(5):1017-1027 (1997)) origin or the poly ubiquitin, *mas* and *Mac*, or *DoubleMac* are especially mentioned to other configuration-vegetable promotors. such a gene -- *ACT11* [for example,] (Huang et al. --) of the *Arabidopsis* origin *Plant Mol.Biol.*33:125-139 (1996), *Cat3* (the [*GenBank*] -- U43147, Zhong et al. --) of the *Arabidopsis* origin *Mol.Gen.Genet.*251:196-203 (1996), the genetic-code stearoyl-acyl carrier protein desaturase (the [*Genbank*] -- X74782, Solocombe et al. --) of the *Brassica napus* origin *Plant Physiol.*104:1167-1176 (1994), *GPc1* (the [*GenBank*] -- X15596, Martinez et al. --) of the corn origin *J. Mol.Biol* 208:551-565 (1989) and *GPc2* (the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[GenBank] U45855, Manjunath et al., Plant Mol.Biol. 33:97 -112 (1997)) of the corn origin are mentioned. A useful promotor is obtained from the Ti plasmid or Ri plasmid of the plant cell and plant virus by which it is found out that a promotor is functional in vegetation, or other host origins to vegetation. In vegetation, as for the promotor of the suitable bacteria for an activity by the approach of this invention, an octopine synthetase promotor, a nopaline synthetase promotor, and a MANOPIN synthetase promotor are mentioned functionally therefore. Ribulose-1, 6-BIPOSUFETO (RUBP) carboxylase small subunit (ssu) promotor, alpha-conglutinin promotor, a phaseolin promotor, an ADH promotor, and a heat shock promotor are mentioned to the promotor of suitable endogenous vegetation. [0106]

E. The promotor of T7, trp, or lambda is mentioned to the promotor for the activity by coli. An imprint end signal is also offered as preferably as a ribosome bond part. About an eukaryotic cell, a control array may also include the donor array and acceptor array of splicing, including typically the promotor who includes the enhancer and polyadenylation array of the origins, such as an immunoglobulin gene, SV40, and a cytomegalovirus, if needed.

[0107]

In yeast for a convenient promotor GAL1-10(Johnson and Davies(1984) Mol.Cell.Biol.4:1440-1448) ADH2(Russell et al. (1983) J.Biol.Chem. 258:2674 -2682) PHO5 () [EMBO] J.(1982) 6:675-680 and MFalpha (Herskowitz and Oshima(1982) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (it Strathern(s))) Jones and ColdSpring edited by Broach Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., and 181 - 209 pages are mentioned. Another suitable promotor for an activity with yeast is an ADH2/GAPDH hybrid promotor which is indicated by Cousens et al. and Gene 61:265-275 (1987). For example, *Aspergillus* like [a useful promotor's example] ADH3 promotor (McKintosh et al., EMBO J.4:2093 2099 (1985)) and a *tpiA* promotor to a yeast-like fungus (McKintosh et al., U.S. Pat. No. 4,935,349) like the stock of a fungus *Aspergillus* The promotor of the *nidulans* glycolysis gene origin is mentioned. The example of a suitable terminator is ADH3 terminator (McKintosh et al.).

[0108]

In some operation gestalten, a polynucleotide is put under an inductive promotor's control and this promotor is a promotor by whom manifestation level is changed by the environmental factor or generating factor of temperature, pH, an anaerobic condition or an aerobic condition, light, a transcription factor, a chemical, etc. and with whom gene expression is oriented. Such a promotor calls it an "inductive" promotor in this description, and can control the timing of the manifestation of an enzyme which participates in composition of glucosyltransferase or nucleotidyl sugar by this promotor.

E. The inductive promotor to coli and other bacteria host cells is well-known to this contractor. For example, a lac promotor is mentioned to these. Especially the desirable inductive promotor for the manifestation of a prokaryote is a duplex promotor containing the tac promotor component which combines the enzyme which participates in galactose metabolite with the promotor component obtained from the gene which carries out a code (for example, promotor of the UDP galactose 4-epimerase gene (*galE*) origin). This duplex tac-gal promotor indicated by the United States patent application 08th for which it applied on November 7, 1997 / No. 965,850 offers the manifestation of level higher than the promotor offered by only one of promotors.

[0109]

the valence promotor for an activity with vegetation -- this contractor -- well-known (Kuhlemeier et al. [for example,] (1987) -- refer to the reference quoted by Ann.Rev.Plant Physiol.38:221) -- and *Arabidopsis* 1 of *thaliana* and the promotor ("ssu" promotor) of a 5-ribulose bis-phosphate carboxylase small subunit gene are included. This promotor is a photosynthesis organization, an anther specific promotor (EP344029), and *Arabidopsis*. It is photoconductive **** only in the seed singularity promotor of *thaliana* (Krebbes et al. (1988) Plant Physiol. 87:859), and is activity.

[0110]

The valence promotor to other organisms is also common knowledge at this contractor. For example, an arabinose promotor, a lacZ promotor, a metallothionein promotor, a heat shock promotor, and the promotor of other many are mentioned to these.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0111]

When put on a suitable host cell, the structure containing a polynucleotide to connect with the genetic regulation signal which drives the manifestation of a polynucleotide possible [actuation] is called a "manifestation cassette." The manifestation cassette which carries out the code of the enzyme which participates in composition of glucosyltransferase and/or nucleotidyl sugar is often put on the expression vector for the installation to a host cell. In addition to an expression vector, this vector includes the nucleic-acid array which enables this vector typically to reproduce independently in one or more selected host cells. Generally, this array is an array which enables this vector to reproduce independently from DNA of a host's chromosome, and includes a replication origin or an autonomous duplicate array. Such an array is common knowledge about various bacteria. For example, the replication origin of a plasmid pBR322 is suitable to almost all Gram(s)-negative bacteria. Or this vector is included in the genome phase complement of a host cell, and may be reproduced by being reproduced when a cell receives replication of DNA. To the manifestation of the enzyme which exists in a bacterial cell, a desirable expression vector is pTGK and this pTGK is indicated by the United States patent application 08th for which it applied on November 7, 1997 / No. 965,850 including a duplex tac-gal promotor.

[0112]

Generally the configuration of a polynucleotide structure needs the activity of the vector which can be reproduced in bacteria. Many kits are marketed for purification of a bacterial plasmid. Directions of a manufacturer are followed for that suitable activity (for example, StrataCleanJ; of EasyPrepJ and FlexiPrepJ(these both are based on Pharmacia Biotech);Stratagene and QIAexpress Expression System, Qiagen). Subsequently, it is isolated, and in order that this refined plasmid may produce the plasmid of further others, it is manufactured, and since a cell is transfected, it is used. Cloning of Streptomyces or Bacillus is possible again.

[0113]

A selectable marker is incorporated by the expression vector often used since the cell of this invention is constituted. These genes can carry out the code of a gene product like the protein needed for survival of the transfected host cell which is increased in an alternative culture culture medium, or growth. The host cell which is not transfected by the vector containing selector genes does not survive by this culture culture medium. Typical selector genes carry out the code of ampicillin, a neomycin, a kanamycin, a chloramphenicol, an antibiotic like a tetracycline, or the protein that gives resistance to other toxins. Or a selective marker can carry out the code of the protein which supplies the important nutrient which complements auxotroph lack or cannot be used from a complex medium (for example, gene which carries out the code of the D-alanine racemase about Bacilli). This vector is reproduced before a vector is introduced into a target cell, for example, it often has one selective marker which functions in E.coli or other cells. Many selective markers are indicated by above Sambrook and others well-known to this contractor. The desirable selective marker for the activity by the bacterial cell is a kanamycin resistant marker (Vieira and Messing, Gene19:259 (1982)). For example, it is more advantageous than ampicillin selection to use kanamycin selection (if it is why, since ampicillin will be promptly decomposed by the beta lactamase in a culture medium), and it makes it possible to proliferate this culture superfluously by this using the cell which cancels a selection pressure and does not contain a vector.

[0114]

In the suitable selective marker for an activity in the cell of mammalian For example, a dyhydrofolic-acid reductase gene (DHFR), a thymidine kinase gene (TK), Or gpt(xanthin-phosphoribosyltransferase);G418, hygromycin which may be chosen using the gene of the procaryote which gives drug tolerance, and a mycophenolic acid, Or puromycin neo which uses and may be chosen ; (Neomycin phosphotransferase) Methotrexate DHFR (dyhydrofolic-acid reductase) which uses and may be chosen is mentioned (). [Mulligan & Berg(1981) Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA78:2072;Southern &] Berg(1982) J.Mol.Appl.Genet.1:327.

[0115]

The selective marker for vegetation and/or other eukaryote cells often gives the resistance over the destruction-of-life agent or antibiotic like a kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, or a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chloramphenicol, clo RUSURU chlorofluorocarbon (chlorsulfuron), or herbicide resistance like Basta. The example of the suitable coding sequence over a selective marker The neo gene which carries out the code of the enzyme neomycin phosphotransferase which gives resistance to an antibiotic kanamycin (Beck(s) (1982) Gene19:327); The code of the enzyme hygromycin phosphotransferase is carried out. and To antibiotic hygromycin, resistance The HOFUFINOSURISHIN acetyltransferase which gives resistance to phosphino SURISHIN and beer RAFOSU which are hyg gene (Gritz and Davies(1983) Gene25:179); and the herbicide compound to give The bar gene which carries out a code (EP242236). [0116]

The configuration of the suitable vector containing the component enumerated on one or more uses a standard connection technique which is indicated by the reference quoted upwards. It is the gestalt for which it asks in order to produce the plasmid needed, and the isolated plasmid or DNA fragment is cut and changed, it reaches and is re-connected. The plasmid may be analyzed by the standard technique so that according to sequencing according to digestion of restriction endonuclease, and/or a well-known approach in order to check a right array in the plasmid constituted. The molecular-cloning technique for attaining these objects is well-known in the field concerned. The suitable extensive various cloning approaches and the suitable in vitro magnification approach for the configuration of a recombination nucleic acid are common knowledge at this contractor. Operation of cloning of these techniques and many is minded. The example of the significant explanation for this contractor Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, 152 volumes, Academic Press, Inc.San Diego, calcium(Berger);, and Current Protocols in Molecular The volumes Biology and on F.M.Ausubel, Current Protocols, Geene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & It is found out by the joint venture (Ausubel) with Sons and Inc. (1998 Supplement). [0117]

Various common vectors suitable since the recombination cell of this invention is constituted are common knowledge in the field concerned. A pBR322 induction vector like pBLUESCRIPTTM and a lambda phage induction vector are mentioned to the common vector for carrying out cloning in bacteria. In the vector in yeast, it is Yeast. An Integrating plasmid (for example, YIp5) and Yeast A Replicating plasmid (YRp system plasmid) and pGPD-2 are mentioned. Generally [versatility] a manifestation in the cell of mammalian may be attained using an available plasmid, and pSV2, pBC12BI, p91023 and a soluble virus vector (for example, a vaccinia virus, adenovirus, and a baculovirus), an episome virus vector (for example, papilloma virus of a cow), and a retrovirus vector (for example, retrovirus of a mouse) are mentioned to these plasmids. [0118]

Especially the approach for introducing into the host cell which has an expression vector chosen is not important, and such an approach is well-known to this contractor. For example, an expression vector may be introduced into the cell (E. coli is included) of a procaryote by the transformation by the calcium chloride, and may be introduced into an eukaryotic cell by the processing or electroporation by calcium phosphate. [0119]

(B. Approach for compounding the saccharide which are a reaction mixture and a product)
This invention offers the approach for preparing the saccharide (this product consisting of two or more saccharide residue) which is a product again using a reaction mixture and the recombination cell of this invention. The recombination cell used in a reaction mixture discovers the nucleotidyl sugar which functions as a sugar donor to at least one glycosyltransferase and a glycosyltransferase. By glucosyltransferase, these reaction mixtures contain the acceptor saccharide from which sugar may be moved again, in order to form a desired oligosaccharide. [0120]

It increases in a culture and the recombination cell of this invention obtains the cell of large number sufficient for the activity in the reaction of a desired scale. The approach and culture culture medium for growth of each host cell are common knowledge at this contractor. In a culture, for example, an aeration spinner, or shaking culture, it may carry out in a fermenter still more preferably. In some operation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gestalten, the gene of this glucosyltransferase is under an inductive promotor's control. Subsequently, generally the manifestation of glucosyltransferase is further induced before processing of a cell during a cell proliferation term and before collection of a cell.

[0121]

When rearranging to desired cell density and proliferating a cell, this cell is typically processed using the reaction mixture and approach of this invention. For example, this cell is destroyed so that introfation processing may be carried out or trespass of the saccharide acceptor to this cell may generally be enabled. The nucleotidyl sugar produced by this glucosyltransferase and this cell is diffused in extracellular fluid from this cell in some situations. The approach of carrying out introfation processing of the cell so that enzyme activity and the stability of nucleotidyl sugar may not be reduced intentionally is well-known to this contractor. Concentration, desiccation, freeze-drying, processing-with surfactant, sonication, mechanical destruction, and enzyme processing etc. may be presented with a cell.

[0122]

Subsequently, the need or this contractor for whom it asks uses the processed cell for the enzyme activity of a glycosyltransferase in the reaction mixture containing the further well-known reactant. The concentration of the processed cell which is used in a reaction mixture It is typically for about 0.1% (humid weight / volume) and 50% (humid weight / volume). More preferably It is for about 1% (humid weight / volume) and about 20% (humid weight / volume), and is the desiccation cell of an amount which is most preferably for about 2% (humid weight / volume) and about 10% (humid weight / volume), or corresponds.

[0123]

This reaction mixture contains a saccharide acceptor again. As opposed to a sialyltransferase a suitable acceptor Generally Gal residue is included. For example, Galbeta1 ->3GalNAc, RAKUTO-N-tetra-OSU, Galbeta1 ->3GlcNAc, Galbeta1 ->3Ara, Galbeta1 ->6GlcNAc, Galbeta1 ->4Glc (lactose), Galbeta1 ->4Glcbeta1-OCH₂CH₃, Galbeta1 ->4Glcbeta1-OCH₂CH₂CH₃, Galbeta1 ->4Galbeta1-OCH₂C₆H₅, Galbeta1 ->4GlcNAc, Galbeta1-OCH₃, a melibiose, a raffinose, a stachyose, and RAKUTO-N-neo tetrapod OSU (LNnT) are mentioned. In some operation gestalten, the sialyltransferase used with the recombination cell and reaction mixture of this invention moves a sialic acid from the most common last that is inherent in the end sialic acid of perfect sialyl-ized carboxylate structure to Galbeta1 and 4GlcNAc array at the 2nd array. Uniquely, the sialyltransferase of three mammals by which cloning was carried out fills the demand of this acceptor, and it is proved that these each moves a sialic acid to N joint mold carboxylate radical of a glycoprotein. The example of the sialyltransferase which uses Galbeta1 and 4GlcNAc as an acceptor is shown in a table 1.

[0124]

(Table 1: Sialyltransferase which uses Galbeta1 and 4GlcNAc saccharide as an acceptor substrate)

[0125]

[A table 1]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

シリアルトランスフェラーゼ	供給源	形成された構造	参照番号
ST6Gal I	哺乳動物	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	哺乳動物	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	哺乳動物	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	発光菌属	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3

- 1) Goochee S (1991) *Bio/Technology* 9: 1347-1355
- 2) Yamamoto S (1996) *J. Biochem.* 120: 104-110
- 3) Gilbert S (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 28271-28276

the nomenclature of a sialyltransferase -- Tsuji et al. (1996) -- refer to *Glycobiology* 6:v-xiv.

[0126]

Other components may contain the cation (for example, Mg⁺² or Mn⁺²), the matter required for ATP playback, phosphoric-acid ion, and organic solvent of bivalence. It depends for various concentration or amounts of reagent which are used for this process on many factors containing selection and the amount of a reaction condition (for example, temperature and a pH value) and the acceptor saccharide glycosylated. If a reaction culture medium is required, it may contain a meltable surfactant (for example, Triton or SDS) and an organic solvent (for example, a methanol or ethanol) again.

[0127]

The temperature at which the above-mentioned process is performed may be range to temperature where almost all the susceptibility enzyme denaturalizes from the congealing point mostly. About 0 degree C - about 110 degrees C of this temperature requirement are more than it more preferably about 20 degrees C - about 30 degrees C or a thermophile.

[0128]

the reaction mixture formed such is enough for a donor saccharide to be added by the acceptor -- time amount maintenance is carried out. Some of products are often detected several hours after, and a recoverable amount is usually obtained within 24 hours. It is desirable to optimize the yield of this process, and the maintenance times are usually about 36 - about 240 hours.

[0129]

The product generated by the above-mentioned process may be used without refining. However, it is usually desirable to collect these products. The technique (for example, thin-layer chromatography or thick layer chromatography, a column chromatography, ion exchange chromatography, or membrane filtration) of the standard common knowledge for recovery of a glycosylation saccharide may be used. It is desirable more preferably membrane filtration and to use a reverse osmotic membrane or one or more column-chromatography techniques because of recovery so that it may argue about the reference quoted below the inside of this description, and in this description. For example, membrane filtration (here, this film has the molecular weight cut-off of about 3000 - abbreviation of 10,000) may be used in order to remove protein. Subsequently, nano filtration (nanofiltration) or reverse osmosis is used, and a salt is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

removed, and the product of or a saccharide can be refined (for example, refer to the United States patent application 08th / No. 947,775 (October 9, 1997 application)). Although the salt of monovalence is penetrated depending on the film with which a nano filtration membrane is used, the salt of many ** and the solute of a larger non-charge than about 100 - 2,000dalton of abbreviation are the reverse osmotic membranes of the class to hold. Therefore, in a typical application, the saccharide prepared by the approach of this invention is held at this film, and the mixed salt is passed.

[0130]

The approach of this invention can generate the product of the saccharide of a request of a large quantity. For example, the product of a saccharide can be generated by the last concentration of about 1 or more mM. About 2.5 or more mM of products of a saccharide are generated by the concentration of about 5 or more mM further more preferably, and the reaction approach of this invention generates the product of a saccharide by the concentration of about 10 or more nMs most preferably.

[0131]

In another approach, each of two or more cell types in a reaction mixture used produces a different glycosyltransferase and corresponding nucleotidyl sugar. the combination (this each generates one nucleotidyl sugar or two or more nucleotidyl sugar, and one or more glycosidic linkages) of the recombination cell of this invention -- continuing -- or it is together put by that either simultaneously, and sugar including two or more new glycosidic linkages can be generated. Therefore, this invention offers the easy approach for generating the oligosaccharide which has two or more association or a polysaccharide, and the polymer structure of relation.

[0132]

an organism -- setting -- a natural path -- minding -- or it is generated by either by the incorporated cycle enzyme -- Production and possible production of a sugar nucleotide, a nucleotide, or PAPS It activates using the original metabolic fate of an organism, and may activate by adding the enzyme of the addition which can generate high energy intermediate products (for example, PEP, the acetyl phosphate, ATP, creatine phosphate, etc.), or can generate the same intermediate product. Therefore, the energy for playback is offered with molecules, such as monosaccharides (for example, a glucose, a fructose, a maltose, a sucrose, etc.), poly phosphate, a pyruvate, alcohol, a fat or a fatty acid, and amino acid. A glucosyltransferase cycle is indicated by 04790 U.S. Pat. No. 5,876,980, 5,728,554, 5,922,577, and the 96th/of a PCT patent.

[0133]

In some operation gestalten, a reaction mixture contains the recombination cell of two or more molds. For example, the organism which generates nucleotide triphosphoric acid required for a cycle reaction be joined to the organism containing all the remaining cycle enzymes required in order to generate the glycosidic linkage of the object (for example, refer to drawing 8 A and 8B). Once it is united, these two organisms will act together, and will complete this cycle, and will generate the target nucleotidyl sugar. The example of instantiation-includes the combination of the bacteria (for example, Corynebacterium) and E.coli stock (this contains one or more plasmids which carry out the code of the remaining enzymes of a GlcNAc cycle) which produce UTP (table 1). In drawing 9 A, a Corynebacterium stock generates UDP to UTP automatically, after a glycosyltransferase reaction, UDP emitted by the reaction in E.coli is returned to this Corynebacterium, and UTP is reproduced here. Two organisms are penetrated and an end product [in / a glucose, an orotic acid, GlcNAc, and the start reagent of a lactose are added, and / this example] is LNT-2. In drawing 9 B, Corynebacterium does not generate sufficient CPT, therefore a CPT synthetase gene is introduced into the cell which carries out the catalyst of the formation of CPT. CPT is diffused into an E.coli cell and the catalyst domain of a 3'-sialyltransferase is combined with the catalyst domain of CMP sialic-acid synthetase in this fusion protein including the exogenous gene to which an E.coli cell carries out the code of the fusion protein. The gene which carries out the code of Glu epimerase and the NeuAc aldolase also exists in E.coli. It may be used, in order that yeast (for example, baker's yeast) may also use a glucose, phosphate, and CMP as a reagent and may reproduce CPT from CMP.

[0134]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The recombination cell, reaction mixture, and approach of this invention are useful although the product of the extensive saccharide which has many applications is compounded. The glycolipid containing disaccharide, an oligosaccharide, a polysaccharide, lipopolysaccharide, a glycoprotein, glycopeptide, and ganglioside is mentioned to the product which may be generated using this approach. The glycosidic linkage of arbitration may be produced using this approach. Although addition of the uronic acid gestalten (for example, glucuronic acid, a galacturonic acid, etc.) of fucose, a sialic acid, a galactose, GlcNAc, GalNAc, a mannose, sugar like a glucose, and these sugar, a xylose, and a fructose is mentioned to such association, it is not limited to these.

Although the following is mentioned to the product of the saccharide which it may be generated using the approach and reaction mixture of this invention, especially is interesting It is not limited to these. : 1. oligosaccharide A reaction mixture and an approach extensive oligosaccharide (the CIAL lactose, a fucosyl lactose, and a GalNAc-lactose --) A GlcNAc lactose, LNnT, LNT, LNT-2, fucosyl-LNnT, Fucosyl-LNT, sialyl-LNnT (LSTd), sialyl - LNT, GalNAc-LNnT, alpha 1, a 3-Gal-lactose, alpha 1, 3-Gal-N-acetyl lactosamine, a STn-antigen, Tn-antigen, T-antigen, HEPARAN, and those glycosides -- containing -- it is useful although generated. Such glycosides may include inclusion of the linker arm for combining with other matter etc.

In some operation gestalten, a recombination cell and a reaction mixture are built for generation of the product of a full KOSHIRU-ized saccharide. GDP-fucose is generated and the following carbohydrate structures are included in the structure where the following may be obtained by the activity of the cell containing a suitable fucosyltransferase enzyme. : [0137]

Gal β -; (2) Gal β (1 \rightarrow 3)[Fuc α (1 \rightarrow 4)]GlcNAc β -; (3) Gal β (1 \rightarrow 4)[Fuc α (1 \rightarrow 3)]GlcNAc β -; (4) Gal β (1 \rightarrow 4)[Fuc α (1 \rightarrow 3)]Glc; (5) -GlcNAc β (1 \rightarrow 4)[Fuc α (1 \rightarrow 6)]GlcNAc β 1 \rightarrow Asn; (6) -GlcNAc β (1 \rightarrow 4)[Fuc α (1 \rightarrow 3)]GlcNAc β 1 \rightarrow Asn; (7) Fuc α (1 \rightarrow 6)Gal β \rightarrow ; (8) Fuc α (1 \rightarrow 3)Gal β -; (9) Glc β (1 \rightarrow 3)Fuc α 1 \rightarrow O-ThrSer; (10) Fuc α 1 \rightarrow O-ThrSer.

[A table 2]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

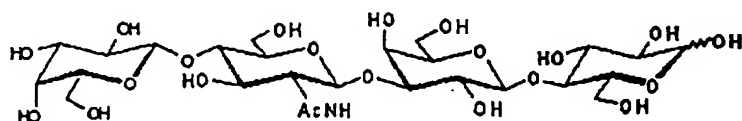
表2: GDP-フコースおよびフコシルトランスフェラーゼを用いて合成されるオリゴ糖構造

オリゴ糖	組織源
Ⅲ ³ フコシル-パラ-ラクト-N-ヘキサオース	ヒト乳
3'-シアリル-3-フコシルラクトース	ヒト乳
ルイス X	造血細胞
ルイス A	造血細胞
シアリルルイスX	造血細胞
シアリルルイス A	造血細胞
ラクト-N-ジフコヘキサオース II	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース I	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース II	ヒト乳
2'-フコシルラクトース	ヒト乳
ラクトジフコテトラオース	ヒト乳
3-フコシルラクトース	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース III	ヒト乳
ラクト-N-ジフコヘキサオース I	ヒト乳
ラクト-N-フコペンタオース V	ヒト乳

Galactoside may be generated again using the recombination cell and approach of this invention. For example, Gal under beta 1, four association, alpha 1, three association, alpha 1, four association or beta 1, and 3 association can be added to the saccharide containing GlcNAc or Glc residue by generating UDP-Gal and using the recombination cell containing suitable galactosyltransferase. These recombination cells are penetrated, and are contacted with an acceptor saccharide, and produce migration of Gal to the acceptor from UDP-GAL. Such oligosaccharides that offer a synthesis method with efficient this invention are RAKUTO-N-neo tetrapod OSU and Galbeta(1-4)-GlcNAcbeta(1-3)-Galbeta(1-4)-Glc (formula I). for example, Min Yuan Chou et al. (1996) -- refer to J.Biol.Chem.271 (32):19166-19173.

[0139]

[Formula 3]



式 I

THIS PAGE BLANK (USPTO)
THIS PAGE BLANK (USPTO)

This invention offers the approach for adding GalNAc or GlcNAc to Gal under beta 1 and 3 association or beta 1, and 4 association by offering the recombination cell which carries out the code of a GalNAc transferase or the GlcNAc transferase, and generates activated UDP-GalNAc or UDP-GlcNAc again. These cells are divided, contact the acceptor part containing Gal residue, and are arranged.

[0140]

Especially in case the recombination cell and reaction mixture of this invention compound the product of the saccharide which needs two or more enzyme-phases, they are useful. In these operation gestalten, a recombination cell may contain two or more exogenous glycosyltransferase genes, and can generate both separate nucleotidyl sugar substrates. Or a reaction mixture may contain two or more kinds of recombination cells, and each of these recombination cells contains one or more exogenous glycosyltransferase genes and corresponding nucleotidyl sugar production systems. For example, the combination of a recombination cell type can be used and the recombination cell type of another side generates UDP-Gal including an exogenous galactosyltransferase gene, including an exogenous sialyltransferase gene and a system for one side of the recombination cell type generating a CMP-sialic acid. In the operation gestalt of this group, once a different cell type combines with an early reaction mixture or the 1st glycosyltransferase reaction approaches completion preferably, the recombination cell type for the 2nd glucosyltransferase reaction may be added by the reaction culture medium. By performing two glycosyltransferase reactions in order within a single container, total yield improves from the procedure in which an intermediate-field kind is isolated. Furthermore, clearance and disposal of an excessive solvent and a by-product decrease.

[0141]

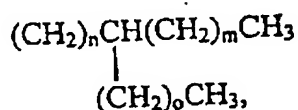
For example, this invention offers the recombination cell and approach for preparing the compound which has the following formulas. : In the formula of NeuAcalpha(2->3) Galbeta(1->4) (Fucalalpha1 ->3) GlcN(R') beta(1->3) Gal beta-OR **, R is hydrogen, a sugar machine, an oligosaccharide radical, or an aglycon radical that has at least one carbon atom. R' may be either acetyl or allyloxy carbonyl (Alloc).

[0142]

With the vocabulary "the aglycon radical which has at least one carbon atom" The thing of an A-Z radical is said. A here - A halogen, a thiol, hydroxy ** Oxygen, sulfur, amino, and imino **** express the alkylene group of 1-18 carbon atoms permuted if needed by ARUKOKISHI.; and Z hydrogen, -OH, -SH, and -NH2, -NHR1, -N(R1)2, -CO2H, -CO two R1, -CONH2, -CONHR1, -CON(R1)2, -CONHNH2, or -OR1 -- it is -- here -- every -- R1 is the alkyl of 1-5 carbon atoms independently.

Furthermore, R [0143]

[Formula 4]



It may be, and it comes out and R2 is [it is n, m, and o=1-18 and] the aromatic series ring permuted variously, the phenyl groups permuted by one or more alkoxy groups (preferably methoxy or O(CH2) mCH3 (being here m= 0-18)), or those combination preferably here in;(CH2) n-R2 (here, it is n=0-18).

[0144]

Process included by composition of these compounds (a) compound: Process which galactosyl-izes the compound of formula GlcNR'beta(1->3) Gal beta-OR under existence of UDP-galactose using galactosyltransferase under sufficient condition to form Galbeta(1->4) GlcNR'beta(1->3) Gal beta-OR; (b) Process which sialyl-izes the compound which uses alpha(2 3) sialyltransferase under the condition in which a salicylic acid transfers to nonreducing sugar and forms the following compound: NeuAcalpha(2->3) Galbeta(1->4) GlcR'beta(1->3) Gal beta-OR, and is formed by (a) under existence of the CMP derivative of a salicylic acid by the sialyltransferase;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The compound formed by (c) and (b) is formed into full KOSHIRU, and the process which offers NeuAcalpha(2->3) Galbeta (1->4) (Fucalpa1 ->3) GlcNR'beta (1->3) Gal beta-OR is included.
[0145]

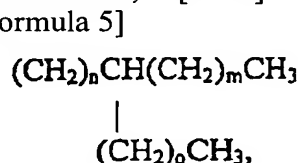
The recombination cell of this invention offers the effective approach for it being separate or performing each of these processes by either of the *****. One or more processes may be performed using the recombination cell of this invention. For example, a galactosyl-ized reaction is attained using an exogenous galactosyltransferase gene **** recombination cell, and this reaction generates UDP-Gal. A sialyl-izing and full KOSHIRU chemically-modified degree may be performed using the recombination cell which generates a suitable glycosyltransferase and donor sugar again, or may be performed using the approach of the conventional non-cell base. In a current desirable operation gestalt, at least two reaction processes are performed using the recombination cell of this invention. The nucleotidyl sugar composition system according to different glucosyltransferase and individual may exist in intracellular [same] or different recombination intracellular containing an exogenous glycosyltransferase gene, and each nucleotidyl sugar production system may be mixed [both]. Therefore, thereby, each of a recombination cell can create easily the customary reaction mixture for carrying out many multi-process glycosylation reactions by mixing and matching the member of the set of a recombination cell including a different glycosyltransferase and a different corresponding nucleotidyl sugar production system.
[0146]

Especially, in a desirable operation gestalt, R is ethyl, it carries out chemically and a galactosyl-izing and sialyl chemically-modified degree is performed by the fucosyl chemically-modified degree within a single container.
[0147]

What can be generated among compounds using the recombination cell of this invention, a reaction mixture, and an approach is sugar of the arbitration which has a salicylic acid and a salicylic-acid part. Compound which has salicyl galactoside (a salicyl lactoside is included) and the following formulas in these: NeuAcalpha(2->3) Galbeta(1->4) GlcN (R') beta-OR or NeuAcalpha(2->3) Galbeta(1->4) GlcN (R') beta(1->3) Gal beta-OR is mentioned.
[0148]

5, 6, 7, the 8-tetrahydro-2-naphth amide whose R' is alkyl or one to acyl 18 carbon in these formulas; they are benzamide;2-naphth amide;4-amino benzamide; or 4-nitro benzamide. R is an aglycon radical which has hydrogen, alkyls C1-C6, a saccharide, an oligosaccharide, or at least one carbon atom. With the vocabulary "the aglycon radical which has at least one carbon atom" The thing of an A-Z radical is said. A here - A halogen, a thiol, hydroxy ** Oxygen, sulfur, amino, and imino **** express the alkylene group of 1-18 carbon atoms permuted if needed by ARUKOKISHI.; and Z hydrogen, -OH, -SH, and -NH2, -NHR1, -N (R1)2, -CO2H, -CO two R1, -CONH2, -CONHR1, -CON (R1)2, -CONHNH2, or -OR1 -- it is -- here -- every -- R1 is the alkyl of 1-5 carbon atoms independently.
Furthermore, R [0149]

[Formula 5]



It may be, and it comes out and R2 is [it is n, m, and o=1-18 and] the aromatic series ring permuted variously, the phenyl groups permuted by one or more alkoxy groups (preferably methoxy or O(CH2) mCH3 (being here m= 0-18)), or those combination preferably here in;(CH2) n-R2 (here, it is n=0-18). R may be 3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) propyl again.
[0150]

the set of the relation of the structure included in a general formula -- Gal -- beta -- it combines with 1 and 3 -- having -- and Fuc -- alpha -- it is combined with 1 and 4. For example, NeuAcalpha2 which are

THIS PAGE BLANK (USPTO)

tetrasaccharide, 3Galbeta1, and 3(1 Fucalpha 4) GlcNAcbeta1 (called SleA here) are recognized by the selectin receptor. Refer to Berg et al., J.Biol.Chem., and 266:14869-14872 (1991). It was shown that the cell by which the transformation was carried out by E-selectin cDNA combines Berg and others [especially] with the neo glycoprotein containing SleA selectively.

[0151]

The approach of this invention is an oligosaccharide compound (Galalpha1, 3Galbeta1, 4Glc1, and 4Glc (R) beta-O-R 1 are included here, R1) which has general formula Galalpha1 and 3Gal- again. It is CH₂ n-COX, and is W=OH, OR₂, and -NHNH₂, and they are R=OH or NAc. - R₂ [and] the aglycon radical which has hydrogen, a saccharide, an oligosaccharide, or at least one carbon atom -- it is -- and n -- 2-18 -- more -- desirable -- the integer of 2-10 -- it is -- it is useful although compounded. It is RAKUTO-N-neo tetrapod OSU (LNnT), GlcNAcbeta1, 3Galbeta1, 4Glc (LNT-2), a sialyl (2 alpha 3)-lactose, and the sialyl (2 alpha 6)-lactose that may be compounded among this compound according to this invention.

[0152]

Generally in the above, these vocabulary is used according to those standard semantics. With the vocabulary "alkyl" used in this description The hydrocarbon group which has 1-20 carbon atoms univalent [of the saturation or partial saturation of branching or non-branching] or divalent is meant. To this The low-grade alkyls (for example, methyl, ethyl, n-propyl, butyl, n-hexyl, etc.) of 1-8 carbon, cycloalkyl (three to 7 carbon), cycloalkyl methyl (four to 8 carbon), and arylated alkyl are mentioned. The vocabulary "alkoxy one" means the alkyl group (for example, ethoxy ** methoxy or n-propoxy) combined with the remainder of the molecule by oxygen. The vocabulary "alkylthio" means with sulfur the alkyl group combined with the remainder of the molecule. The vocabulary with "acyl" says the radical guided from an organic acid by clearance of hydroxyl. an example -- acetyl, a propionyl, and me -- oil and myristoyl are mentioned.

[0153]

The vocabulary "aryl" means the radical guided from aromatic hydrocarbon by clearance of one atom (from benzene to for example, phenyl). One aromatic hydrocarbon may have many partial saturation rings (for example, naphthyl).

[0154]

The vocabulary "alkoxy one" means the alkyl group (for example, ethoxy ** methoxy or n-propoxy) combined with the remainder of the molecule by oxygen.

[0155]

The vocabulary "alkylthio" means the alkyl group combined with the remainder of the molecule with sulfur.

[0156]

A "ARUKANO amide" radical has general formula-NH-CO- (C₁ - C₆ alkyl), and even if it permutes, it does not need to be permuted. When permuting, the substituent is the hydroxyl typically. Especially this vocabulary contains two desirable structures, an acetamide, -NH-CO-CH₃ and a hydroxy acetamide, and -NH-CO-CH₂-OH.

[0157]

The vocabulary "a heterocyclic compound" has three or more atoms, and means the ring compound whose at least one of those atoms is except carbon (for example, N, O, S, Se, P, or As). A furan (for example, a furanose gestalt of a pentose like fucose is included), a pyran (for example, a pyranose gestalt of a hexose like a glucose and a galactose is included), a pyrimidine, a pyrazine, etc. are mentioned as the example of such a compound.

[0158]

(2. Glycolipid including ganglioside and the structure of relation)

The reaction mixture and cell of this invention are useful although the glycolipid from which many differ is generated again. In the glycolipid in which especially interest is held, they are lactosylceramide, glycosyl ceramide, and GUROBO. - H, GUROBO tetrose, lipopolysaccharide, and various gestalten of those lipids are mentioned. For example, this lipid may be changed so that it may become RISO, deacetyl, a linker arm content gestalt, or O-acetyl gestalt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0159]

In order to obtain desired ganglioside, other glycosphingolipid, or those derivatives, this invention is a specific format and offers the reaction mixture, cell type, and approach for adding parts for one or more sugar part. The approach of this invention includes the activity of the cell which discovers one or more recombination glycosyltransferases for compounding the Glico sphingoid (ganglioside and other Glico sphingoids being included). The activity of the glycosyltransferase for combining a desired carbohydrate with precursor branching can attain desired association with high singularity. In some operation gestalten, a fatty-acid part is removed from a sphingoid precursor before a glycosyltransferase reaction, and to use an organic solvent, in order to promote/or this reaction is wished. the enzyme and reaction scheme for generating much ganglioside and the structure of relation are indicated to PCT patent application PCT/US / 25470 transferred to the same people under simultaneous continuation -- having -- this -- June 10, 1999 -- the [official report] -- it was officially announced with the heading "Enzymatic synthesis of ganglioside" as WO 99/28491.

[0160]

The approach of this invention is useful although much ganglioside and the structure of relation are generated. Much target ganglioside is Oettgen, H.F. et al., and Gangliosides. and It is indicated by Cancer, VCH and Germany 1989, 10-15 pages, and the reference quoted there. What is found out by other supply sources enumerated by a brain and the following table 3 is mentioned to the ganglioside which leans especially an interest.

[0161]

[A table 3]

表3: ガングリオシドの式および略語

構造	略語
Neu5Ac3Gal4GlcCer	GM3
GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM2
Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GM1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4Gal4GlcCer	GM1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal4GlcCer	GD3
GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD2
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1a
Neu5Ac3Gal3(Neu5Ac6)GalNAc4Gal4GlcCer	GD1α
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GD1b
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1a
Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1b
Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5Ac8Neu5Ac3)Gal4GlcCer	GT1c
Neu5Ac8Neu5Ac3Gal3GalNAc4(Neu5Ac8Neu5c3)Gal4GlcCer	GQ1b

Nomenclature of Glycolipids, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (Recommendations 1997); *Pure Appl. Chem.* (1997) 69: 2475-2487; *Eur. J. Biochem* (1998) 257: 293-298) (www.chem.qmw.ac.uk/iupac/misc/glylp.html).

(Glycopeptide)

The product of a saccharide is combined with a polypeptide in some operation gestalten. Therefore, the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

reaction mixture and cell of this invention are useful, although a glycoprotein is changed and various amelioration of property properties, such as a therapy-half-life and immunogenicity, is attained. For example, a STn-peptide, Tn-peptide, T-peptide, ST-peptide, and the joint gestalt of such structures are mentioned as the example of glycopeptide in which especially an interest is held. The enzyme and reaction of a glycoprotein useful to an alteration are indicated by the PCT patent application USs 98/00835 (this was exhibited as WO 98/31826 on July 23, 1998).

[0162]

(4. Polysaccharide)

the product of the saccharide which may be compounded using the reaction mixture and cell of this invention -- for example, heparin, a heparan sulfate, chondroitin, hyaluronic acid, Delmer Than, and a mole cricket -- a tongue, the carrageenin, alginate, an agar, guar RUGAMU, a fructan, glucan, a cellulose, a chitin, and chitosan are mentioned. Each derivatization gestalt (for example, desulfurization oxidized-form voice, a acetylation gestalt, an anhydrous gestalt, or a derivatization gestalt) of these products may be compounded again using the recombination cell, approach, and reaction mixture of this invention.

[0163]

In some operation gestalten, a recombination cell and a reaction mixture are used in order to compound a sulfation polysaccharide (a heparin sulfuric acid, a heparan sulfate, and a carrageenin sulfuric acid are included). Many biological processes contain sulfation biomolecule (U.S. Pat. No. 5,919,673; Varki (1993) Glycobiology3:97). For example, sialyl RUISU X (SLeX) which has a sulfate radical in the 6th place of a galactose is the ligand to L-selectin (Hemmerich(es) (1994) Biochemistry33:4830), and a sulfation Lewis a (Lea) tetrapod and 5 sugar are powerful inhibitor of E-selectin association (Yuen et al. (1994) J.Biol.Chem. 269:1695). Other sulfation molecules which participate in much cell functions are glucosaminoglycans (van Boechel et al. (1993) Angew.Chem.Int.Ed.Eng. 32:1671). Sulfation of a hydroxy steroid gives the hydrophilic gestalt for blowdown (Ogura et al. (1989) Biochem.Biophys.Res.Commun. 165:169). The heparan sulfate proteoglycan on cell surface combines growth factors, various enzymes, and various protease inhibitor, and adjusts living body activity. In order to compound a heparan sulfate and the compound of relation, a reaction mixture and an approach are shown in drawing 11 A - 11D.

[0164]

a) Enzymatic synthesis of a polysaccharide frame This invention offers the recombination cell, reaction mixture, and approach for compounding heparin, a heparin sulfuric acid, the compound of relation, and the polysaccharide frame of a polysaccharide without other relation. Generally such a polysaccharide frame consists of repeating units of two or more sugar residue. For example, generally heparin and the polysaccharide frame of the compound of relation consist of glucuronic acid-GlcNAc repeating units. These repeating units use the approach of the cell base of this invention, and may be compounded in enzyme. These approaches have one saccharide which forms a repeating unit as a nonreduction end of an acceptor saccharide, and include the activity of the acceptor saccharide which ends in the part to which a glycosyltransferase can add one of the saccharides of a repeating unit. In the case of a heparan sulfate, HEPARAN and the acceptor saccharide which is the compound of relation have end glucuronic acid or GlcNAc residue preferably. The enzyme which participates in the biosynthesis of heparin is [for example, / Salmivirta / FASEB] (1996). It is indicated by J.10:1270-1279.

[0165]

A repeating unit is compounded by contacting an acceptor saccharide to a reaction mixture, and this reaction mixture contains the microorganism or plant cell which offers the enzyme system for forming the nucleotidyl sugar (for example, UDP-GlcNAc to a heparan sulfate and the compound of relation) which can work as a sugar donor to one of the repetition saccharides. This microorganism or plant cell generates a recombination glycosyltransferase (for example, GlcNAc transferase) again, and this recombination glycosyltransferase carries out the catalyst of the transition of the sugar from nucleotidyl sugar to an acceptor saccharide, and generates the acceptor saccharide which ends in specific sugar residue. A reaction mixture contains the microorganism or plant cell which offers the enzyme system for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

forming the nucleotidyl sugar (UDP-glucuronic acid [as opposed to / For example, / a heparan sulfate and the compound of relation]) of the 2nd repetition saccharide again, and offers the recombination transferase (for example, glucuronic acid transferase) to this 2nd repetition saccharide. This 2nd transferase carries out the catalyst of the transition of the 2nd repetition saccharide from nucleotidyl sugar to an acceptor saccharide, and this acceptor saccharide is here and is ended by the 1st repetition saccharide. This reaction advances until the polysaccharide frame of the desired die length is compounded. Especially, in a desirable operation gestalt, nucleotidyl sugar is generated by the regenerative cycle of nucleotidyl sugar so that it may be indicated in this description.

[0166]

A recombination glycosyltransferase and a corresponding nucleotidyl sugar composition system may exist in a cell type which may exist in intracellular [same] or is different, respectively.

[0167]

b) Sulfation reaction This invention offers the approach of generating a sulfation compound (a heparin sulfuric acid, a heparan sulfate, and a sulfation polysaccharide like carrageenin being included) again. For example, the approach for compounding heparin, a heparan sulfate, and the compound of relation includes the process contacted to the reaction mixture containing the microorganism or plant cell which contains the following for a HEPARAN polysaccharide frame. : The enzyme system for forming aPAPS; it reaches. Recombination sulfotransferase which is b recombination sulfotransferase, carries out the catalyst of the transition of the sulfate from the PAPS to a HEPARAN polysaccharide frame, and generates N-sulfation polysaccharide.

[0168]

Preferably, a sulfation reaction uses the cell which can generate effectively the sulfate donor PAPS (3'-phospho adenosine -5'-phospho sulfate). PAPS can work as a sulfate donor to the sulfotransferase, and this sulfotransferase can carry out the catalyst of the sulfation of an oligosaccharide and a steroid. U.S. Pat. No. 5,919,673 indicates a PAPS regenerative cycle including the activity of some enzymes (drawing 10). The example of the reaction scheme of this invention for which a PAPS regenerative cycle is used is shown in drawing 11 A-D. This approach may be used in order to generate a sulfating agent [activity / for generating sulfation sugar], and PAPS (for example, refer to drawing 11 A-D).

[0169]

The cell which offers the enzyme of a PAPS regenerative cycle in addition to the sulfotransferase is used in the desirable operation gestalt of existing of this invention. The inclusion to the organism which generates PAPS of the gene which carries out the code of one sulfotransferase or two or more sulfotransferase is either by addition of a PAPS cycle playback enzyme automatically, and enables sulfation of an oligosaccharide or a polysaccharide. This process may be performed adding the sugar sulfated to this PAPS sulfation organism, or by adding a PAPS content organism to other organisms which can form the glycosidic linkage of target sugar. A PAPS enzyme may be introduced by either which minds the plasmid which can generate the target enzyme activity by genome insertion to an organism. Like an example, a PAPS cycle enzyme and HEPARAN, or three sulfotransferase required for sulfation of heparin are added by the organism, and when the polysaccharide frame by which either HEPARAN or heparin is not sulfated is added by this organism under suitable conditions, it is sulfated and this polysaccharide generates sulfation HEPARAN or heparin.

[0170]

c) Epimerization of glucuronic acid In order to generate the compound of a heparan sulfate, HEPARAN, and relation, the approach of this invention contacts N-sulfation polysaccharide to glucuronic acid C5-epimerase, and may include further the process which changes one or more glucuronic acid residue in a polysaccharide frame into iduronic acid. In a current desirable operation gestalt, glucuronic acid C5-epimerase exists in a reaction mixture, and is offered by the cell which discovers the gene which carries out the code of this epimerase. the nucleic acid which carries out the code of the guru clo nil C5-epimer of mammalian -- the [for example, / PCT application] -- it is indicated by SE 98/No. (opened to the public as WO 98/48006 on October 29, 1998) 00703.

[0171]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

d) O-sulfation It is O, when one or more iduronic acid residue contacts an iduronic acid content N-sulfation polysaccharide to one or more O-sulfotransferase, consequently finally forms a heparan sulfate or the compound of relation in some operation gestalten. - It is sulfurated. Moreover, in a current desirable operation gestalt, O-sulfotransferase and a PAPS reversion system are offered by the recombination cell type which exists in a reaction mixture. suitable O-sulfotransferase -- the [for example, / PCT application] -- it is indicated by No. US98/22597 (opened to the public as WO9922005 on May 6, 1999); and U.S. Pat. No. 5,834,282, 5,817,487, 5,877,713, 5,773,274, and 5,541,095.

[0172]

(5. Drugs and other applications)

Subsequently, the above-mentioned compound may be used as a therapy agent as various applications, for example, an antigen, a diagnostic drug, and foods. Therefore, this invention offers the pharmacological constituent which may be used in the treatment of various conditions again. A pharmacological constituent consists of oligosaccharides produced according to the above-mentioned approach.

[0173]

The pharmacological constituent of this invention is suitable for the activity in various drug delivery systems. The suitable formula object for the activity in this invention is Remington's. Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing It is found out by Company, Philadelphia, PA, and the 17th edition (1985). About the easy total theory of the approach attached to drug delivery, they are Langer and Science. Refer to 249:1527-1533 (1993).

[0174]

Local, taking orally, local *****, or endermic administration is meant in prophylactic [a pharmacological constituent] and/or parenteral [for therapeutic measures / by aerosol], and a nasal cavity. Generally, a pharmacological constituent is parenteral (for example, intravenous) disaccharide merit ****. Therefore, this invention offers the constituent for parenteral administration which contains in aquosity carriers (for example, water, buffer water, a physiological saline, PBS, etc.) preferably the carrier which can be received, and the compound dissolved or suspended. These constituents may contain the adjuvants (for example, pH regulator and a buffer, a tonicity regulator, a wetting agent, a surfactant, etc.) which can be received on a pharmaceutical-sciences target which is needed for suitable physiological conditions.

[0175]

These constituents may be sterilized by the conventional sterilization technique, or sterilization filtration may be carried out. For an activity, packaging of the water solution obtained may be carried out as it is, or it is freeze-dried, and the freeze-dried preparation object is set by the sterilization aquosity carrier before administration. pH of this preparation object -- typical -- between 3 and 11 -- more -- desirable -- 5-9 -- and it is 7-9 most preferably.

[0176]

In some operation gestalten, the oligosaccharide of this invention may be included in the liposome formed from a standard vesicle formation lipid. Various approaches which are indicated by Szoka et al., Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467 (1980), U.S. Pat. No. 4,235,871, 4,501,728, and 4,837,028 are available in order to prepare liposome. Target-ization of the liposome which uses various target-ized agents (for example, sialyl galactoside of this invention) is common knowledge in the field concerned (for example, refer to U.S. Pat. No. 4,957,773 and 4,603,004).

[0177]

The constituent containing an oligosaccharide may be prescribed for the patient for prophylactic and/or therapeutic measures. In a therapy-application, the patient who has already ****(ed) the above diseases is medicated with a constituent in sufficient amount to prevent the disease and the symptom of the complication selectively, even if it recovers or is few. A suitable amount to attain this is defined as a "therapy-effective dosage." Although it depends for an amount effective in this application on a patient's weight and general condition whenever [of that disease] critical and, about a 70kg patient, from about 0.5mg per day, it is the range of about 40g oligosaccharide, and, more generally the dosage of about

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5mg - about 20g [per day] compound is used.

[0178]

Two or more administration of the single of this constituent may be carried out by the dosage level and the pattern which are chosen by the medical practitioner who takes a measure. Anyway, a pharmacological formula object must offer the amount of the oligosaccharide of sufficient this invention to deal with the patient effectively.

[0179]

An oligosaccharide can find out the application as a diagnostic drug again. For example, a labeled compound may be used in order to position the field of the inflammation in a patient with the misgiving of inflammation, or neoplasm metastasis. About this application, this compound may be labeled with a suitable radioisotope (for example, ^{125}I , ^{14}C , or titanium).

[0180]

The oligosaccharide of this invention may be used as immunogen for generating a reactant monoclonal antibody or a reactant polyclonal antibody specifically with the compound of this invention. The technique of many with this available contractor may be used by this invention for generation of various immunoglobulin molecules, and actuation. An antibody may be generated by well-known various means in the field concerned.

[0181]

Generation of nonhuman monoclonal antibodies (for example, a mouse, a rabbit, a horse, etc.) is common knowledge, and may be attained by, for example, immunizing the animal by the preparation object containing the oligosaccharide of this invention. Immobilization of the antibody forming cell obtained from the immunized animal is carried out, it is screened, or is first screened about production of a desired antibody, and, subsequently is immortality-ized. About the argument on the general procedure of monoclonal antibody production, they are Harlow and Lane, Antibodies, and A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Refer to Publications and N.Y. (1988).

[0182]

The following examples are only offered for the object of instantiation, and it is meant that neither a limit nor a convention carries out this invention.

[0183]

(Example 1)

(Manifestation of CMP-sialic-acid synthetase / α 2, and 3 sialyltransferase fusion protein)

This example discovers CMP-sialic-acid synthetase / α 2, and 3 sialyltransferase fusion protein, and indicates the activity of the single cell type which produces a 3'-sialyl lactose comparatively cheaply.

This approach is roughly shown in drawing 1.

[0184]

(A. A cell carries out the superfluous manifestation of the CMP-sialic acid)

The transformation was carried out to the plasmid DNA containing the gene which carries out the code of IPTG induction CMP-NAN synthetase / α 2, and the 3 sialyltransferase fusion protein for the stock (nanA neuS::TN10 variation) of E.coli (Ev240) which carried out genetic manipulation so that a CMP-sialic acid (CMP-NAN) might be produced. It increased to OD600 of 2-3, and the culture medium of 1L in LB culture medium was moved to 20 degrees C, and was guided by IPTG for 16 hours. These culture medium was collected and centrifugal separation recovered the cell pellet. Subsequently, :250mM which mixed the 7g cell pellet with the following transparency-ized processing solutions, and started the reaction A galactose, 250mM A fructose, 10mM A lactose, 100mM KH_2PO_4 , 20mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH7.0) and 1% Xylene.

[0185]

It acted as the monitor of the generation of a 3'-sialyl lactose by TLC and HPLC. 43 hours after, when the reaction mixture was measured by TLC(it visualizes by silica and isopropanol: NH_4OH : H_2O (7:1:2) and OSHINORU); $R_f=0.8$, and HPLC(BioRad Aminex column HPX- 87 four in H and H_2O sulfuric acid of mM); $R_t=6.3$ minutes, it generated the product of 2.2 mg/mL.

[0186]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(B. Reaction mixture supplemented with a sialic acid and CPT)

In this example, the effectiveness of a transparency-ized solution (as for this, the sialic acid of 10mM(s) and CPT of 10mM(s) are added) over the reaction of an example 1 is examined. About the cell culture liquid indicated in the example 1, it is 250mM. A galactose, 250mM A fructose, 10mM A lactose, 100mM KH₂PO₄, 20mM MgSO₄·7H₂O, pH7.0, 1% It mixes with the transparency-ized solution (as for this, a 10mM sialic acid and 10mM(s) CPT are filled up) of a xylene. MONITASU [a reaction / with TLC and HPLC] so that it may be indicated by the example 1. By adding an additional sialic acid and CPT to a reaction mixture, in a recombination E.coli cell, CMP-NAN of high level arises rather than available, therefore the 3'-sialyl lactose product of higher level is led.

[0187]

(C. Activity of the E.coli cell which does not carry out superfluous production of the CMP-sialic acid)

In this example, CMP-sialic-acid synthetase / alpha 2, and 3 sialyltransferase fusion protein are discovered in the E.coli stock which does not carry out superfluous production of the CMP-sialic acid.

[0188]

AD202 which discovered fusion protein including the catalyst domain of 2 and 3-sialyltransferase and CMP sialic-acid synthetase The culture medium of 100mL(s) of E.coli was proliferated with the shaker in 37 degrees C and 200rpm. The manifestation of fusion protein will be guided using IPTG, shortly after this culture medium reaches OD600 equal to 0.85. This culture medium was incubated at 30 degrees C overnight. About 2.0g bacterial cell pastes were collected from this culture medium.

[0189]

0.1M It heated until it prepared and boiled the solution containing HEPES (pH7.5), and 1% of xylene was added after that. 10mM after cooling this solution to about 37 degrees C A lactose, 10mM CPT and 10mM(s) The sialic acid was added. Subsequently, this solution was thoroughly mixed with the 2.0g bacterial cell paste, and it incubated at 37 degrees C with the shaker by 150rpm overnight.

[0190]

It acted as the monitor of the amount of the CIAL lactose formed of this reaction by thin-layer chromatography (TLC) and HPLC. 44 hours after, when determined by TLC (silica; isopropanol /NH₄OH/H₂O (7/1/2), and orcinol visualization, R_f= 0.8) and HPLC (BioRad Aminex column HPX- 87 4 in H and H₂O the sulfuric acid of mM, R_t= 6.3 minutes), all the lactoses were consumed and the concentration of the remaining 3'-sialyl lactose was 7.04mM (70% of yield).

[0191]

(Example 2)

This example indicates the approach for compounding the sialyl-ized saccharide for which two sorts of organisms are used. One rough display of these approaches is shown in drawing 9 B. It is the same as that of that a reaction mixture is indicated to be by the example 1 except for CPT being produced with yeast or an organism like Corynebacterium.

[0192]

The transformation of the stock (EV240) (nanA neuS::Tn10 variation) of E.coli by which genetic manipulation was carried out so that the superfluous manifestation of the CMP-NAN might be carried out is carried out by the plasmid DNA which carries out the code of IPTG induction CMP-sialic-acid synthetase / alpha 2, and the 3-sialyltransferase fusion protein. It guides so that the culture medium of these bacteria may be increased and fusion protein may be produced. It is 1% in order to start a reaction. A xylene, 250mM A glucose, 250mM A fructose, 25mM A lactose, 20mM MgSO₄·7H₂O (pH7.0), 100mM KH₂PO₄ (pH7), 10mM A cell pellet is added in the solution containing CMP of a sialic acid and the amount of catalysts. This solution is 20% (w/v) again. Baker's yeast is contained. Yeast is used in order to produce and reproduce the nucleotide CPT used in a sialic-acid cycle (in order that a fructose, a glucose, and CMP may produce this CPT, used with yeast). E. The CMP-NAN synthetase catalyst domain of the fusion protein discovered by coli produces CPT and NAN to CMP-NAN, and, subsequently a sialyltransferase catalyst domain reproduces 3' sialyl lactose.

[0193]

This reaction will be refined by a standard procedure and a standard technique, if it acts as a monitor and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

completes so that it may be indicated by the example 1.

[0194]

The organism (for example, *Corynebacterium*) of the arbitration which carries out the superfluous manifestation of the UTP, and discovers a CMP-synthetase gene, and the organism of the arbitration which produces CPT similarly may be used in this approach. It may be used in order that the yeast which exogenous myokinase may be added by the reaction mixture or discovers myokinase may help to carry out the catalyst of the generation of CPT.

[0195]

(Example 3)

This example indicates the activity of the cell polymorphism containing the exogenous gene which carries out the code of the enzyme which participates in composition of a CMP sialic acid from GlcNAc. Refer to drawing 9 B.

[0196]

The culture medium of the *E.coli* stock JM 101 which discovers alpha 2, 3-sialyltransferase / CMP sialic-acid synthetase fusion protein, GlcNAc2'-epimerase, and sialic-acid aldolase is increased, and it guides so that these enzymes may be discovered. Cell pastes are collected and it adds in the solution which includes this cell paste for GlcNAc, a pyruvate, a lactose, CPT, the buffer solution, and other reagents in order to start this reaction.

[0197]

It acts as the monitor of the formation of a 3'-sialyl lactose which is the product of this reaction by TLC or HPLC, and when this reaction is completed, a 3'-sialyl lactose is isolated in a standard technique and a standard procedure.

[0198]

Instead of added CPT, yeast or *Corynebacterium* (the gene for CPT synthetase is discovered) may be used in order to produce and reproduce CPT used at the same reaction as what is indicated by the example 2.

[0199]

(Example 4)

In this example, the *E.coli* stock which discovers only 3-sialyltransferase / alpha 2 and CMP sialic-acid synthetase fusion protein is used with the baker's yeast which produces CPT.

[0200]

It guides so that the culture medium of AD202 bacteria which discovers 3-sialyltransferase / alpha 2 and CMP sialic-acid synthetase fusion protein may be increased and this fusion protein may be discovered. Cell pastes are collected and they are 250mM(s). A glucose, 250mM A fructose, 25mM A lactose, 20mM MgSO₄.7H₂O (pH 7.0), 100mM KH₂PO₄ (pH 7), 10mM A sialic acid, 1% A xylene, 5mM It adds in the solution containing CMP and 20% (w/v) baker's yeast, and a reaction is started. It acts as the monitor of this reaction by TLC and HPLC, and generation of a product is pursued. Completion of a reaction refines the product in a standard technique and a standard procedure.

[0201]

(Example 5)

In this example, the *E.coli* stock EV5 which is a stock which carries out superfluous production of the sialic acid is used. E. Carry out the transformation of the coli stock by the plasmid which carries out the code of a sialyltransferase / the CMP-sialic-acid synthetase fusion protein. Once it increases this culture medium and a plasmid product is discovered, these cells are collected and it is 250mM. A galactose, 250mM A fructose, 10mM A lactose, 100mM KH₂PO₄, 10mM CPT, 1% xylene, and 20mM(s) The solution containing MgSO₄.7H₂O (pH 7.0) is added, and this reaction is started. It acts as the monitor of the generation of a 3'-sialyl lactose so that it may be indicated by the example 1, and a well-known procedure and a well-known protocol refine it to this contractor.

[0202]

Instead of CPT added, yeast or *Corynebacterium* (the gene for CPT-synthetase is discovered) is set for the same reaction of a format as a thing indicated by the example 2, and it can be used in order to

THIS PAGE BLANK (USPTO)

produce and reproduce CPT.

[0203]

(Example 6)

The reaction in this example produces a nucleotide and nucleotidyl sugar, and uses the single organism which carries out the catalyst of the transition to the acceptor saccharide of a saccharide. It guides so that the culture medium of *Corynebacterium* which discovers alpha 2, 3-sialyltransferase / CMP sialic-acid synthetase fusion protein, and CPT-synthetase may be increased and these enzymes may be discovered. Subsequently, cell pastes are collected and it adds in the solution containing a lactose, a galactose, an orotic acid, a sialic acid, the buffer solution, and other reagents. If it acts as the monitor of the formation of the 3'-sialyl lactone which is the product of a reaction by TLC or HPLC and completes, it will isolate with a standard technique and a standard procedure.

[0204]

(Example 7)

This example indicates Galalpha1 of trisaccharide, and the activity of the organism which discovers an enzyme required to produce beta 1 and 4-GlcNAc 3 Gal. This organism contains the exogenous gene which carries out the code of the enzyme of a galactosyltransferase cycle. Refer to drawing 9 A.

[0205]

The culture medium of *Corynebacterium* which discovers UDP glucose pyrophosphorylase, UDP-glucose-4'-epimerase, beta 1, 4-galactosyltransferase and alpha 1, and 3-galactosyltransferase is increased, and it guides so that these enzymes may be discovered. Subsequently, in order to start a reaction, the solution containing GlcNAc, an orotic acid, the buffer solution, and other reagents is added to this cell paste. If it acts as the monitor of the formation of Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc of trisaccharide which is a product by TLC and HPLC and completes, this product will be isolated with a standard technique.

[0206]

The example and operation gestalt which are indicated in this description are only for the object of instantiation, various alterations or modification in consideration of these are proposed by this contractor, and being contained in the pneuma of this description and an attached claim and within the limits is understood. All the periodicals quoted in this description, a patent, and patent application are used as reference in this description for all the objects.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1 A]

In addition to being used in order that corresponding nucleotidyl sugar may produce the product of a saccharide, drawing 1 A shows the example of the cell which discovers a single exogenous glycosyltransferase gene (in this example, a 3' - and 6'-sialyl lactose is produced, respectively). The *E.coli* cell shown in drawing 1 A is a specific stock which exists a CMP-sialic acid (CMP-SA) naturally, including the exogenous gene which carries out the code of the 3'-sialyltransferase.

[Drawing 1 B]

In addition to being used in order that corresponding nucleotidyl sugar may produce the product of a saccharide, drawing 1 B shows the example of the cell which discovers a single exogenous glycosyltransferase gene (in this example, a 3' - and 6'-sialyl lactose is produced, respectively). In drawing 1 B, since this stock does not produce the CMP-sialic acid of an amount naturally enough, including an exogenous 6'-sialyltransferase gene, as for an *E.coli* cell, this kind also contains an exogenous CMP-sialic-acid synthetase gene. A desired sialyl lactose is compounded in addition of the lactose to a manifestation and reaction mixture of these enzymes, and a reaction substrate required for others.

[Drawing 2]

Drawing 2 shows the example of the scheme of the enzymatic synthesis based on a cell of producing nucleotidyl sugar with a various glycosyltransferase manifestation cell. Since two or more nucleotidyl sugar is produced by the cell, a cell may be designed so that two or more exogenous glycosyltransferases may be discovered. Therefore, a product [need / two or more glycosides / to be connected] may be

THIS PAGE BLANK (USPTO)

compounded using a single living thing. In this specific example, the GlcNAc transferase and galactosyltransferase which are the exogenous gene which carries out the code of the two different glycosyltransferases are introduced into E.coli which exists naturally in UDP-GlcNAc and UDP-Gal which are each nucleotidyl sugar donor about these two enzymes. In the manifestation of these two glycosyltransferases, the reactant as which an acceptor saccharide and others are required is added by the cell, in order to produce the product of a saccharide, and RAKUTO-N-neo tetrapod OSU (neotetraose) (LNnT).

[Drawing 3]

Drawing 3 illustrates an N-acetyl-guru KOSAMIDO transferase cycle which is indicated by U.S. Pat. No. 5,922,577.

[Drawing 4]

Drawing 4 shows a UDP-galactose cycle.

[Drawing 5]

Drawing 5 shows a GDP-fucose cycle.

[Drawing 6]

Drawing 6 shows an UDP-GlcNAc cycle.

[Drawing 7]

Drawing 7 shows a CMP-sialic-acid cycle.

[Drawing 8 A]

Drawing 8 A shows the example of approach in case a glycosyltransferase manifestation cell does not produce the nucleotidyl sugar or the nucleotide to which an amount corresponds enough. This is conquered by introducing into intracellular the gene which carries out the code of some the enzyme or all the enzymes of a sugar nucleotide regenerative cycle. beta to which the code of the specific enzyme shown is carried out by the exogenous gene -- 1 and 4 Production of GalNAc-beta 1 and 4-lactose using the E.coli cell which discovers a GalNAc transferase is included. E. Since a coli cell does not produce the UDP-GalNAc nucleotidyl sugar donor or UTP of an amount enough, in addition to a GalNAc transferase gene, the enzyme (shown in drawing 3) about a UDP-GlcNAc cycle is introduced into intracellular. In drawing 8 A, as for the system of the UDP-GlcNAc production in an E.coli cell, UDP-GalNAc epimerase, UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, a GlcNAc-1-kinase, a polyphosphoric acid kinase, and a pyruvate kinase are mentioned.

[Drawing 8 B]

Drawing 8 B shows the example of approach in case a glycosyltransferase manifestation cell does not produce the nucleotidyl sugar or the nucleotide to which an amount corresponds enough. This is conquered by introducing into intracellular the gene which carries out the code of some the enzyme or all the enzymes of a sugar nucleotide regenerative cycle. beta to which the code of the specific enzyme shown is carried out by the exogenous gene -- 1 and 4 Production of GalNAc-beta 1 and 4-lactose using the E.coli cell which discovers a GalNAc transferase is included. E. Since a coli cell does not produce the UDP-GalNAc nucleotidyl sugar donor or UTP of an amount enough, in addition to a GalNAc transferase gene, the enzyme (shown in drawing 3) about a UDP-GlcNAc cycle is introduced into intracellular. Drawing 8 B shows the activity of the path of the alternative for the biosynthesis of UDP-GalNAc, and, as for this, enzyme UDP-GalNAc pyrophosphorylase, a GalNAc-1-kinase, a polyphosphoric acid kinase, and a pyruvate kinase are mentioned. The gene which carries out the code of each of these enzymes is introduced into E.coli intracellular with the gene to a GalNAc transferase. These enzymes are discovered after a reaction substrate (the lactose as an acceptor is included) is added.

[Drawing 9 A]

Drawing 9 A shows the scheme of the example in the case of being used in order that the living thing of two molds may produce nucleotidyl sugar. In each case, one cell type (Corynebacterium) produces a nucleotide, and other cell types carry out the catalyst of the addition to the nucleotide of sugar, and form nucleotidyl sugar. The second cell type discovers a corresponding glycosyltransferase again, and the code of this is carried out by the exogenous gene. In drawing 9 A, desired reaction products are alpha-1 and 3-Gal-LacNAc. This reaction mixture contains naturally Corynebacterium or yeast which

THIS PAGE BLANK (USPTO)

compounds UDP to UTP. With the second cell type, UTP is activated, UDP-galactose is formed, and this contains the exogenous gene which carries out the code of the enzyme (namely, UDP-Gal 4' epimerase, UDP-Glc pyrophosphorylase, hexokinase, and phosphoglucomutase) with which a GlcNAc cycle remains. The exogenous gene which carries out the code of alpha 1 and the 3-Gal transferase also exists in the second cell type. UTP produced with *Corynebacterium* or yeast invades into an *E. coli* cell, and is changed into UDP-Gal by the cycle enzyme, and, subsequently to the inside of a reaction mixture, works as a donor about the galactosyltransferase medium shift to the LacNAc acceptor which exists again. This reaction emits UDP reused by passing along *Corynebacterium* or yeast, and phosphorylation of it is carried out and it is set to UTP here.

[Drawing 9 B]

Drawing 9 B shows the scheme of the example in the case of being used in order that the living thing of 2 molds may produce nucleotidyl sugar. In each case, one cell type (*Corynebacterium*) produces a nucleotide, and other cell types carry out the catalyst of the addition to the nucleotide of sugar, and form nucleotidyl sugar. The second cell type discovers a corresponding glycosyltransferase again, and the code of this is carried out by the exogenous gene. The scheme shown in drawing 9 B is useful in order to produce a 3'-sialyl lactose. *Corynebacterium* or yeast is again used, in order to produce the nucleotide which needs nucleotidyl sugar with the cell designed so that CPT might be produced by installation of the exogenous gene which carries out the code of the CMP synthetase. E. : which discovers the enzyme with which a *coli* cell is contained in CMP-sialic-acid composition from CPT -- CMP-sialic-acid synthetase is discovered as fusion protein with a 3'-sialyltransferase in this case. A GlcNAc epimerase enzyme and a NeuAc aldolase enzyme are also produced. This path changes CPT into a CMP-sialic acid, and, subsequently commits this path as a donor about the shift to the lactose acceptor part of a sialic acid.

[Drawing 10]

Drawing 10 shows the graph of the enzyme-cycle about production of PAPS which works as a donor about the sulfotransferase. This drawing is the U.S. Pat. No. 5,919,673 origin, and this offers detailed explanation of a PAPS cycle. Simply, a PAPS cycle offers a single pot reaction system in case the adenosine content part (AMP, ADP, ATP, APS, PAPS, and PAP) by which phosphorylation was carried out is reused, although the sulfotransferase carries out the catalyst of the shift to an acceptor part from PAPS of a sulfate radical. In drawing, "PEP" makes reference in a phospho enol pyruvate, and "Pyr" makes reference in a pyruvate.

[Drawing 11 A]

Drawing 11 A illustrates the example of the reaction scheme which uses the cell designed so that the enzyme of the reversion system about the activity sulfate-ized agent PAPS may be discovered. When used combining the sulfotransferase, these cells can produce sulfate-ized sugar. The specific example shown includes the activity of the tobacco cell for production of heparin or HEPARAN. The tobacco cell for large-scale composition which does not produce PAPS of an amount naturally enough is designed so that a PAPS cycle enzyme gene and a 3'-sulfotransferase gene, a 6' - sulfotransferase gene and 2'-sulfotransferase gene, an IZURO nil epimerase gene, and an IZURONIRU-N-sulfotransferase gene may be included. In drawing 11 A, refined K5 polysaccharide is used as an acceptor and the product acquired is a heparin sulfuric acid.

[Drawing 11 B]

Drawing 11 B illustrates the example of the reaction scheme which uses the cell designed so that the enzyme of the reversion system about the activity sulfate-ized agent PAPS may be discovered. When used combining the sulfotransferase, these cells can produce sulfate-ized sugar. The specific example shown includes the activity of the tobacco cell for production of heparin or HEPARAN. The tobacco cell for large-scale composition which does not produce PAPS of an amount naturally enough is designed so that a PAPS cycle enzyme gene and a 3'-sulfotransferase gene, a 6' - sulfotransferase gene and 2'-sulfotransferase gene, an IZURO nil epimerase gene, and an IZURONIRU-N-sulfotransferase gene may be included. Drawing 11 B is deformation of this scheme accompanied by K5 polysaccharide produced by the second cell type contained in a reaction mixture rather than it is provided as a isolation

THIS PAGE BLANK (USPTO)

mold.

[Drawing 11 C]

Drawing 11 C illustrates the example of the reaction scheme which uses the cell designed so that the enzyme of the reversion system about the activity sulfate-ized drugs PAPS may be discovered. When used combining the sulfotransferase, these cells can produce sulfate-ized sugar. The specific example shown includes the activity of the tobacco cell for production of heparin or HEPARAN. The tobacco cell for large-scale composition which does not produce PAPS of an amount naturally enough is designed so that a PAPS cycle enzyme gene and a 3'-sulfotransferase gene, a 6'-sulfotransferase gene and 2'-sulfotransferase gene, an IZURO nil epimerase gene, and an IZURONIRU-N-sulfotransferase gene may be included. Drawing 11 C shows another deformation in case a heparin core polysaccharide is produced by the yeast cell or bacterial cell which produces UDP-GlcNAc which works as donor sugar about beta 1, a 4-GlcNAc transferase, beta 1, exogenous 4-glucuronyl transferase, and an exogenous UDP-Glc dehydrogenase, and UDP-Glc. Subsequently, the obtained heparin core polysaccharide which is produced by a yeast cell or the bacterial cell is simultaneous, or continuously, is that either and is added by the cell which produces PAPS.

[Drawing 11 D]

Drawing 11 D illustrates the example of the reaction scheme which uses the cell designed so that the enzyme of the reversion system about the activity sulfate-ized drugs PAPS may be discovered. When used combining the sulfotransferase, these cells can produce sulfate-ized sugar. The specific example shown includes the activity of the tobacco cell for production of heparin or HEPARAN. The tobacco cell for large-scale composition which does not produce PAPS of an amount naturally enough is designed so that a PAPS cycle enzyme gene and a 3'-sulfotransferase gene, a 6'-sulfotransferase gene and 2'-sulfotransferase gene, an IZURO nil epimerase gene, and an IZURONIRU-N-sulfotransferase gene may be included. Drawing 11 D shows still more nearly another deformation of this scheme about heparan sulfate production. Aspergillus which discovers a PAPS cycle enzyme nigar does not produce ATP of an amount, or PAPS cycle drugs enough. In order to produce sufficient ATP, the third cell type (for example, yeast) is contained in a reaction mixture.

[Drawing 12]

Drawing 12 illustrates the example of a reaction system based on the cell about the enzymatic synthesis of three processes of the ganglioside GM2 (GalNAcbeta4(Neu5Acalpha3)Galbeta4GlcCer) from a RISO-glucosylceramide acceptor or a lactosylceramide acceptor. this reaction -- galactosyl-izing of an acceptor -- addition to the galactose of GalNAc residue is included succeedingly. Finally, a sialic acid is added. In the illustrated reaction scheme, the cell which exists UDP-GalNAc and UDP-Gal naturally is designed so that beta 1 of the exogenous gene origin, a 4-GalNAc transferase and beta 1, and 4Gal transferase may be discovered. These cells are introduced into a reaction mixture with the second cell type (for example, Corynebacterium or yeast) containing the exogenous gene which produces CPT naturally and carries out the code of the required enzyme about composition of a CMP-sialic acid. As for the exogenous gene about CMP-sialic-acid composition, CMP-sialic-acid synthetase, GlcNAc epimerase, NeuAc aldolase, and CMP-synthetase are mentioned. The second cell type also discovers alpha 2 and 3-sialyltransferase in which a code is carried out by the exogenous gene.

[Drawing 13]

Drawing 13 shows one example of the scheme of the reaction of the cell base about the enzymatic synthesis of ganglioside GD2 (GalNAcbeta4(Neu5Acalpha8Neu5Acalpha3)-Galbeta4GlcCer). This process includes four enzyme-reaction processes which produce GD2 from a RISO-GURUGO sill ceramide acceptor or a lactosylceramide acceptor. As shown in [drawing 12](#), two cell types are used, and one produces exogenous alpha2 and 3-sialyltransferase and exogenous alpha2, 8-sialyltransferase, and a sugar nucleotide CMP-sialic acid, and another cell type contains the exogenous gene which carries out the code of beta 1, a 4-GalNAc transferase and beta 1, and the 4-Gal transferase. This cell type exists each nucleotidyl sugar donor about these two glycosyltransferases, UDP-GalNAc, and UDP-Gal naturally. GD2 is produced by each continuous reaction of four enzymes on the occasion of addition of an acceptor molecule and other required reaction substrates.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Drawing 14]

Drawing 14 shows the example of the scheme of the reaction of the cell base about composition of 3'-sialyl-LNnT (LSTd). Two cell types are used. E.coli which is the first cell type in this example exists nucleotidyl sugar UDP-GlcNAc and UDP-Gal naturally. The exogenous gene which carries out the code of beta 1, a 3-GalNAc transferase and beta 1, and the 4-Gal transferase is introduced into intracellular. The second cell type produces the CMP-sialic acid which is the sugar donor demanded again including the gene of the outpatient department student who does the code of alpha 2 and the 3-sialyltransferase. Introducing both cell types into a reaction mixture with the reactant of the lactose as an acceptor and others of which it is required produces production of LSTd.

[Drawing 15 A]

Drawing 15 A shows the example of the scheme of the reaction of the cell base for producing the product of Galalpha1 and the saccharide which stops in beta 1 and a 4GlcNAc-part 3 Gal. In drawing 15 A, the cell which exists UDP-galactose naturally is changed so that the exogenous gene which carries out the code of alpha 1, 3-galactosyltransferase and beta 1, and the 4-galactosyltransferase may be discovered. On the occasion of addition of acceptor sugar GlcNAc-R, first, two galactosyltransferases commit beta 1 and 4-connection galactose so that alpha 1 and 3-connection termination galactose may subsequently be added one by one.

[Drawing 15 B]

Drawing 15 B shows the example of the scheme of the reaction of the cell base for producing the product of Galalpha1 and the saccharide which stops in beta 1 and a 4GlcNAc-part 3 Gal. Drawing 15 B shows the deformation when not producing sufficient UDP-galactose, although a cell type produces sufficient UTP about large-scale composition. In order to correct this situation, the gene which carries out the code of the enzyme (for example, UDP-Gal4'-epimerase and UDP-GlcNAc pyrophosphorylase) contained in UDP composition is introduced into intracellular. These enzymes carry out the catalyst of the conversion to UDP-Gal from reactant glucose-1-phosphate, and this commits them one by one as a sugar donor about each of two galactosyltransferases. Furthermore, two Gal residue is connected with a GlcNAc-R acceptor saccharide.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

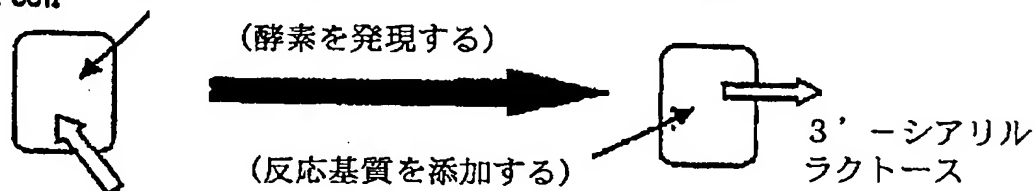
2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1 A]

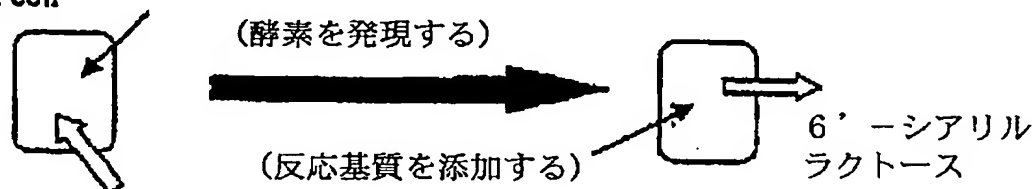
E. coli ヌクレオチド糖、CMP-SAをすでに産生する



3'-シアリルトランスフェラーゼまたは
ST融合タンパク質遺伝子を含む
プラスミドを挿入する

[Drawing 1 B]

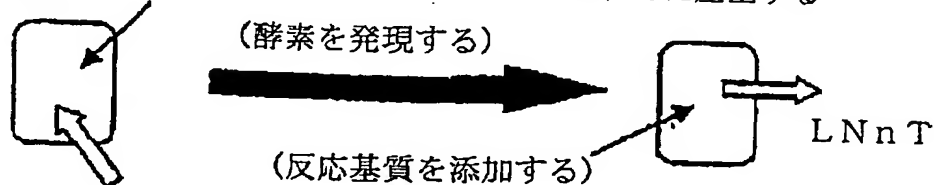
E. coli ヌクレオチド、CTPをすでに産生する



6'-シアリルトランスフェラーゼおよび
CMP-SAシンターゼ遺伝子を含む
プラスミドを挿入する

[Drawing 2]

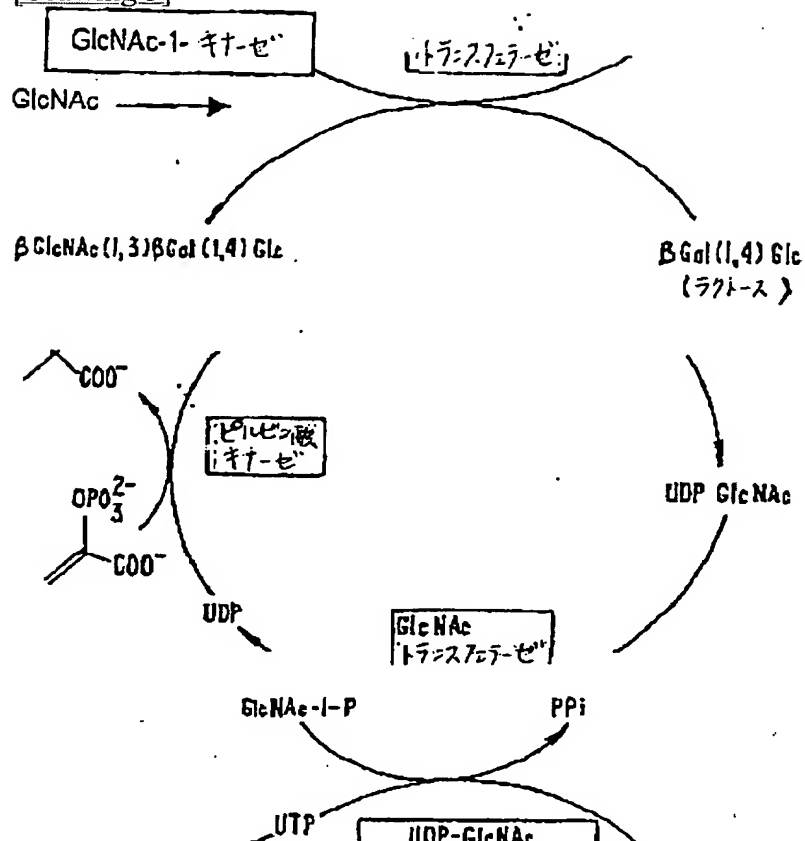
E. coli ヌクレオチド糖、UDP-GlcNAc
およびUDP-ガラクトースをすでに産生する



GlcNAcトランスフェラーゼおよび
ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子
を含むプラスミドを挿入する

THIS PAGE BLANK (USPTO)

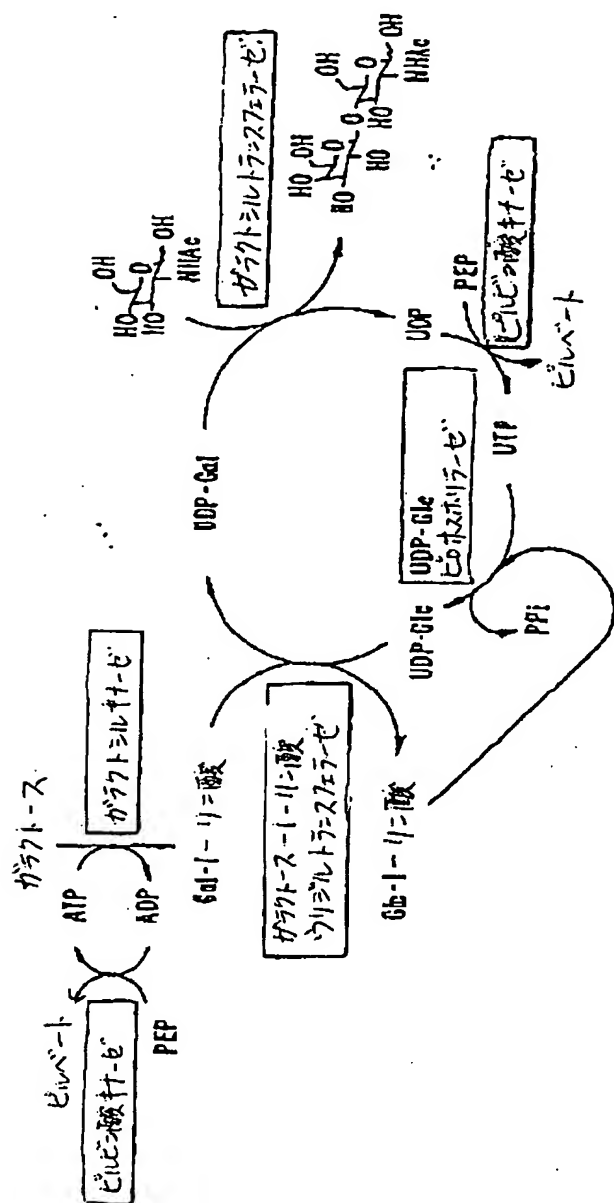
[Drawing 3]



[Drawing 4]

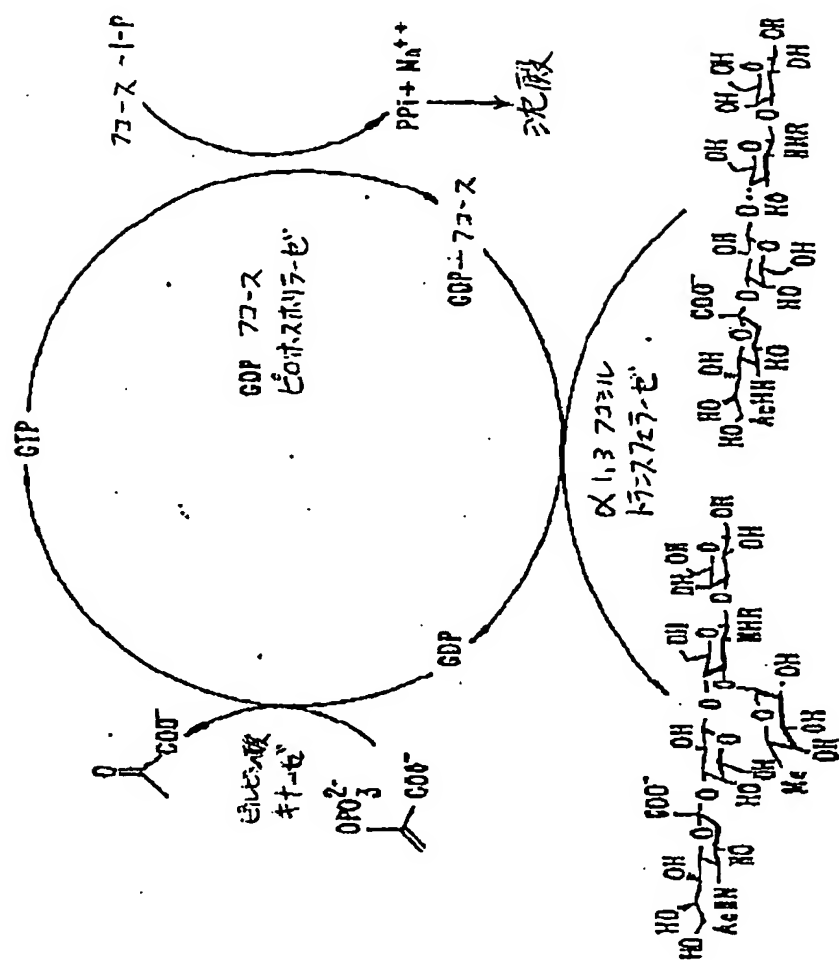
THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS



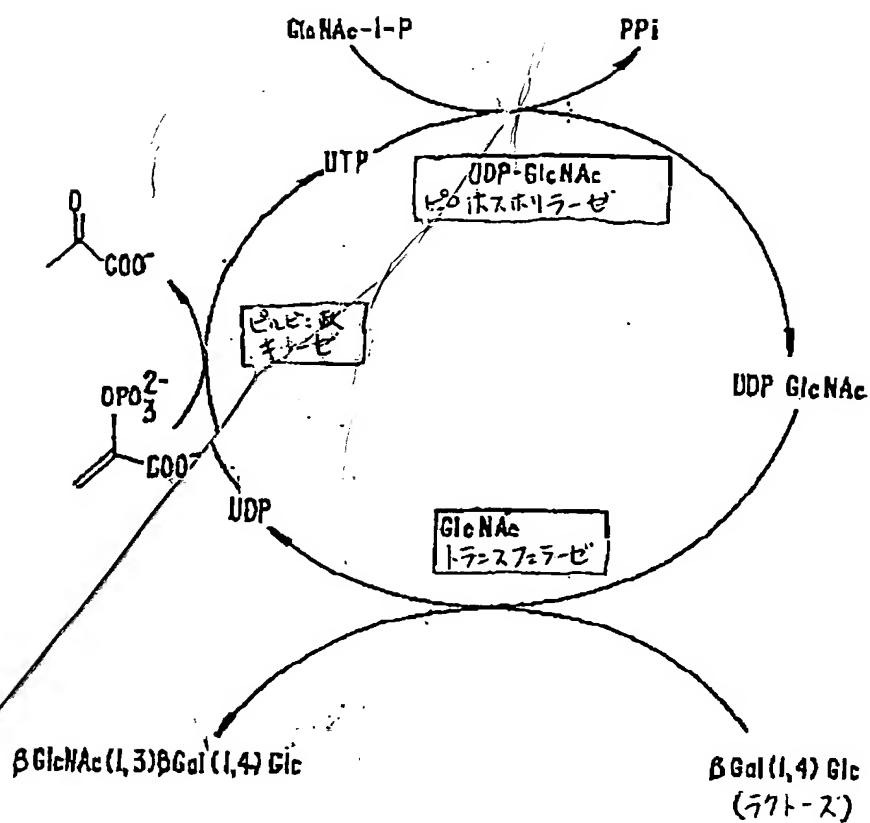
[Drawing 5]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

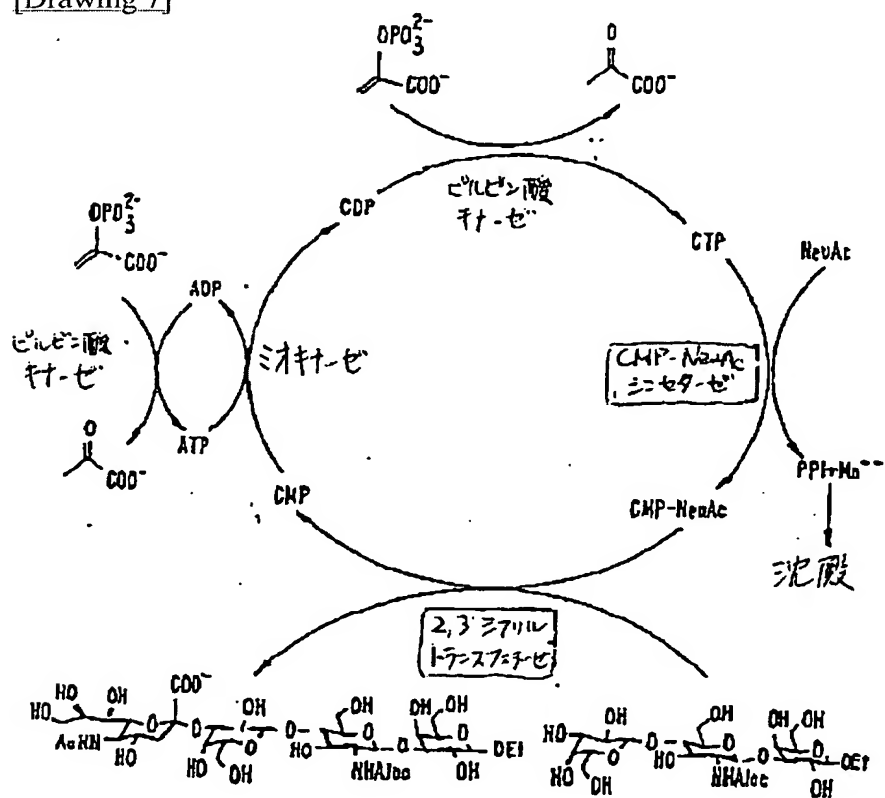


[Drawing 6]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

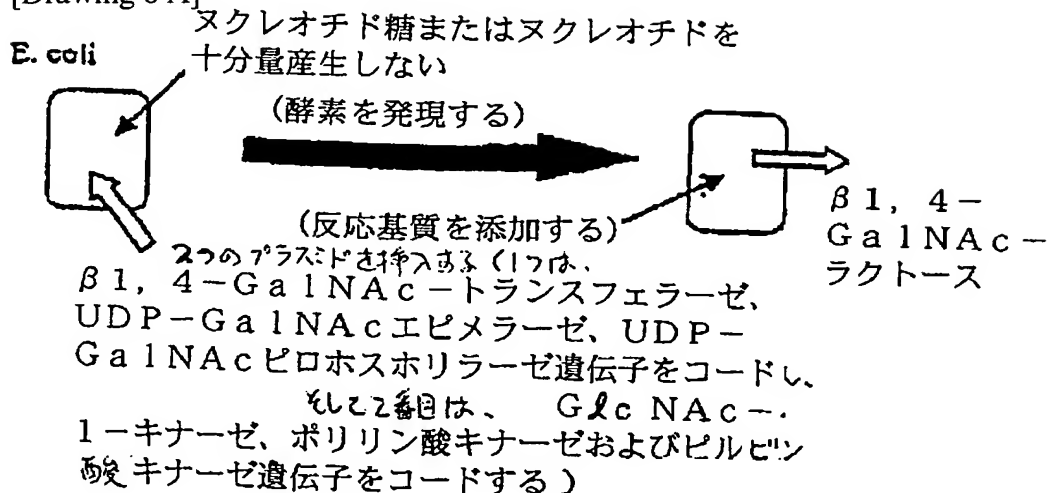


[Drawing 7]

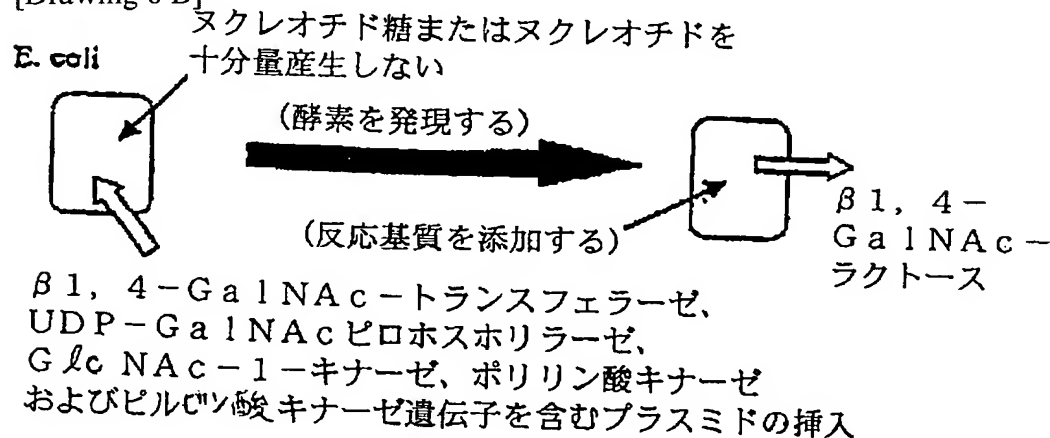


THIS PAGE BLANK (USPTO)

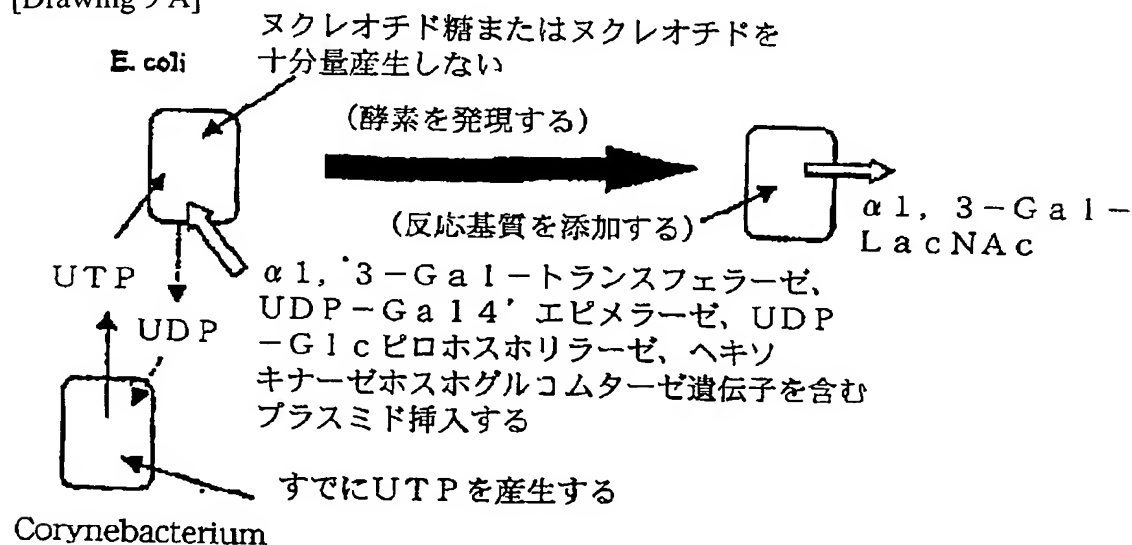
[Drawing 8 A]



[Drawing 8 B]

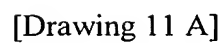


[Drawing 9 A]

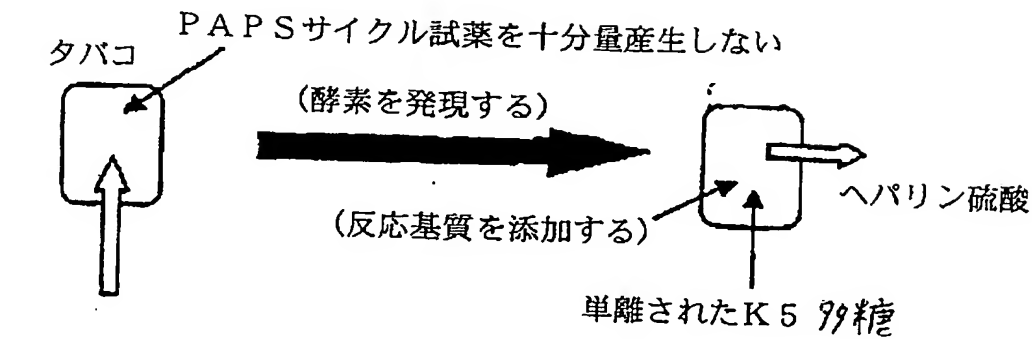


[Drawing 9 B]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

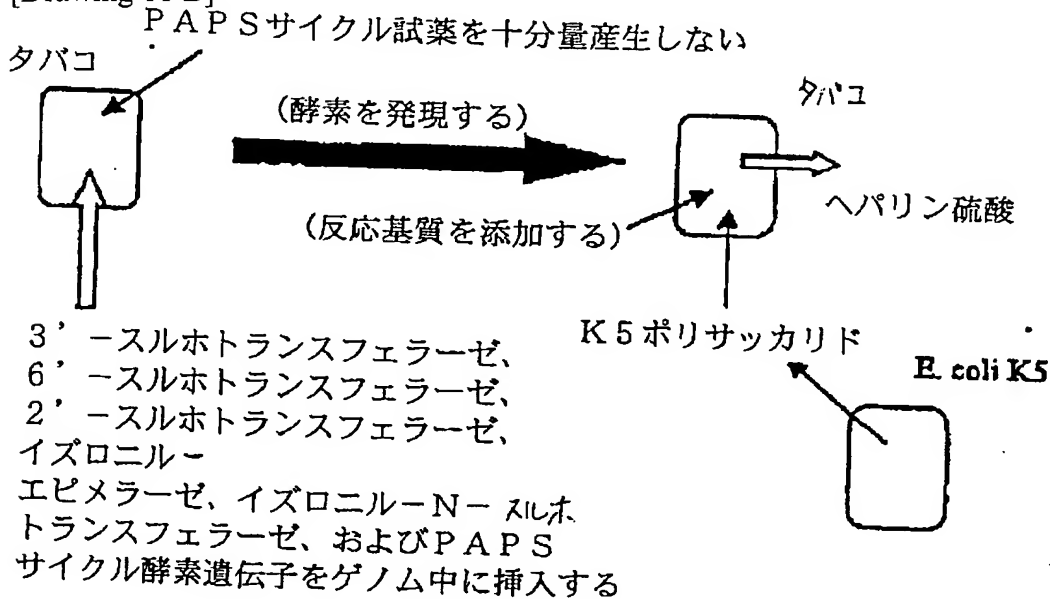


THIS PAGE BLANK (USPTO)



3'-スルホトランスフェラーゼ、6'-スルホトランスフェラーゼ、
2'-スルホトランスフェラーゼ、イズロニル-
エピメラーゼ、イズロニル-N-スルホトランスフェラーゼ、および PAPS
サイクル酵素遺伝子をゲノム中に挿入する

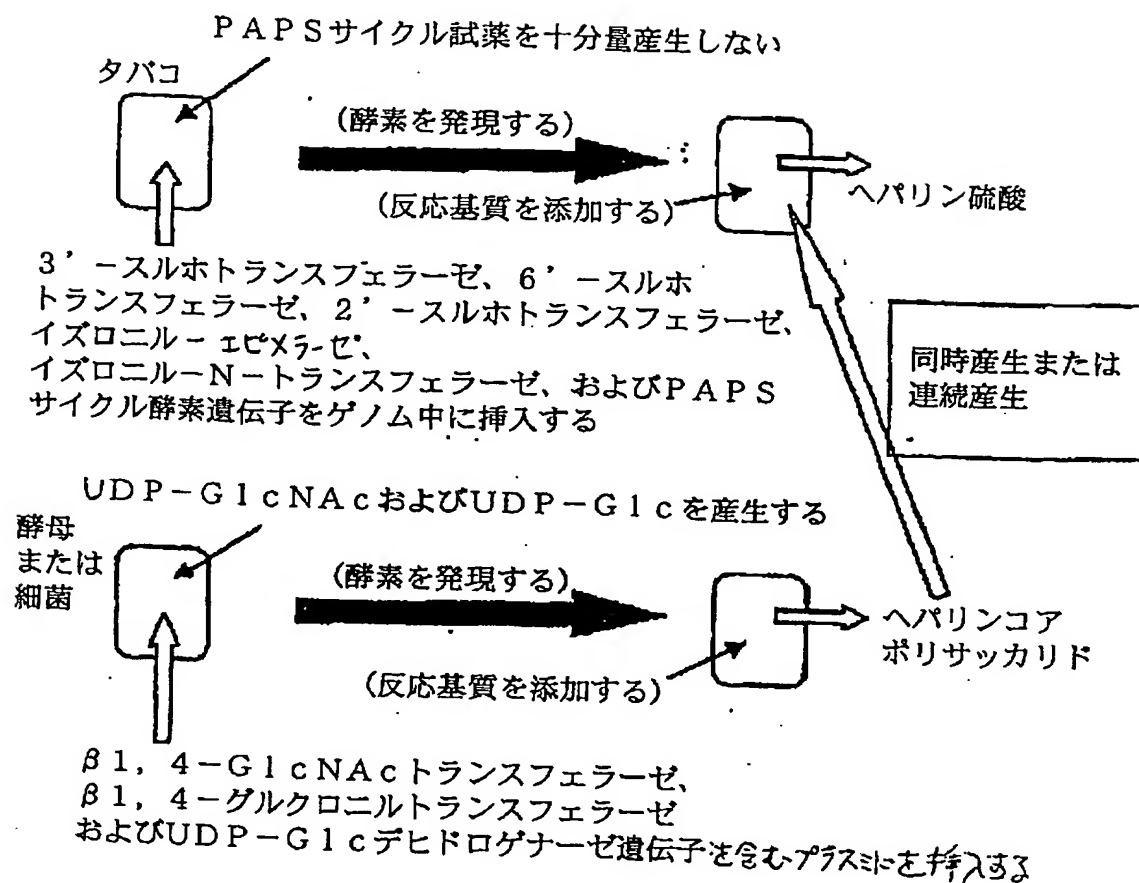
[Drawing 11 B]



3'-スルホトランスフェラーゼ、
6'-スルホトランスフェラーゼ、
2'-スルホトランスフェラーゼ、
イズロニル-
エピメラーゼ、イズロニル-N-スルホ
トランスフェラーゼ、および PAPS
サイクル酵素遺伝子をゲノム中に挿入する

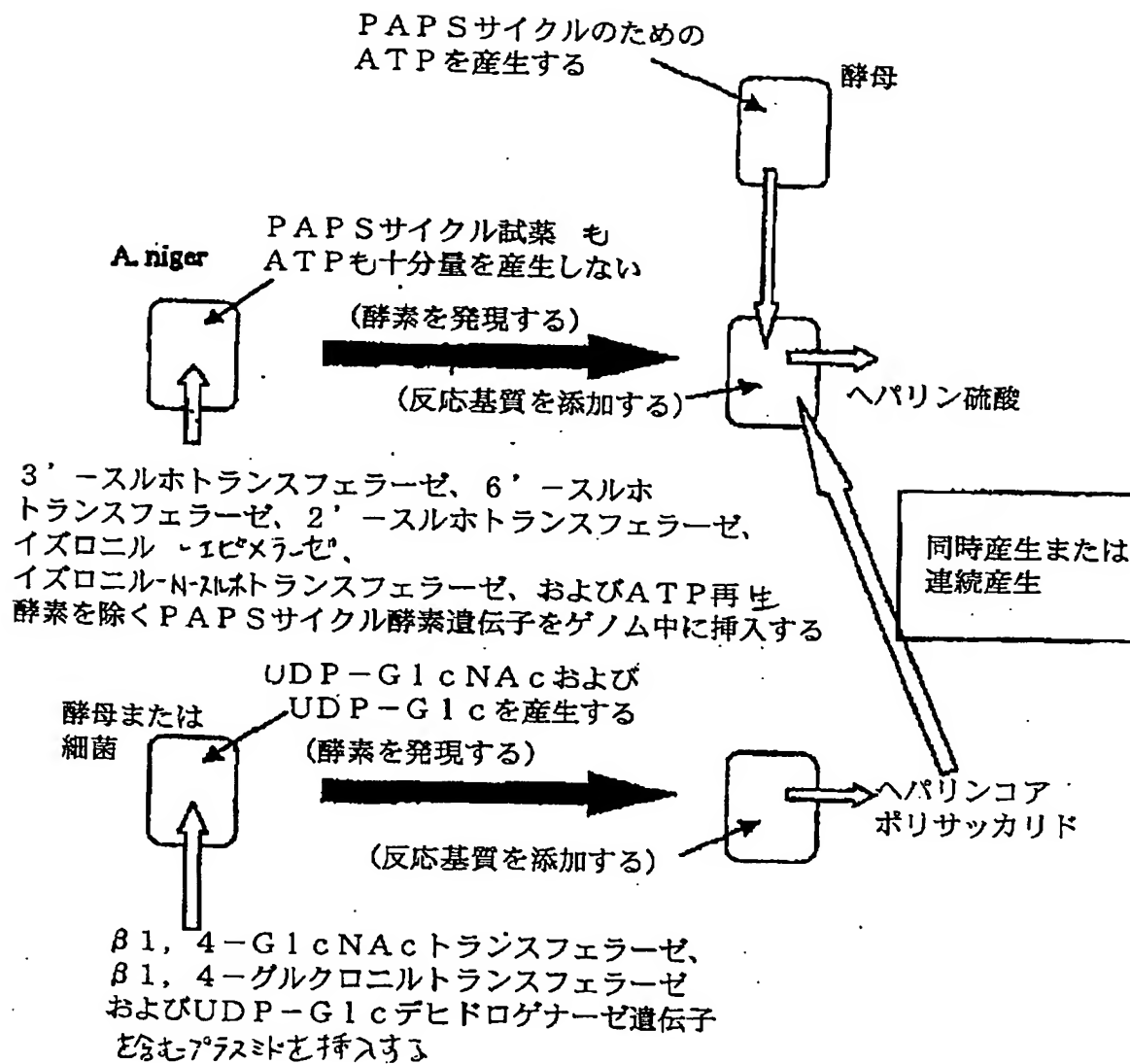
[Drawing 11 C]

THIS PAGE BLANK (USPTO)



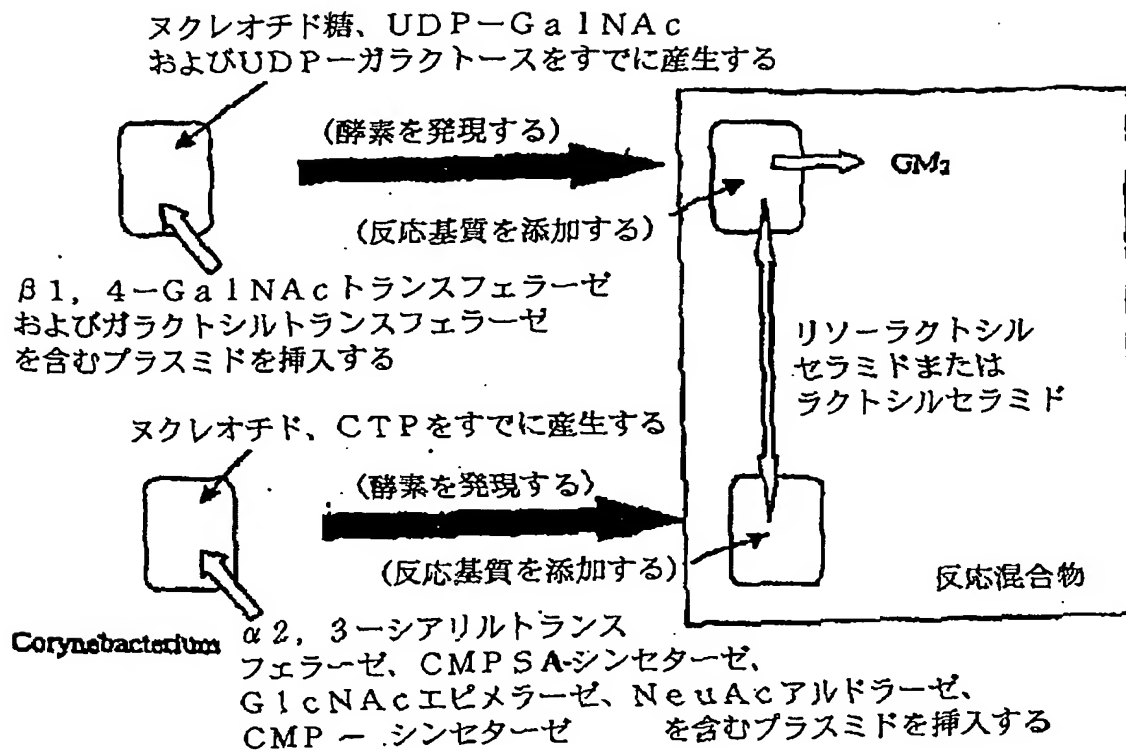
[Drawing 11 D]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

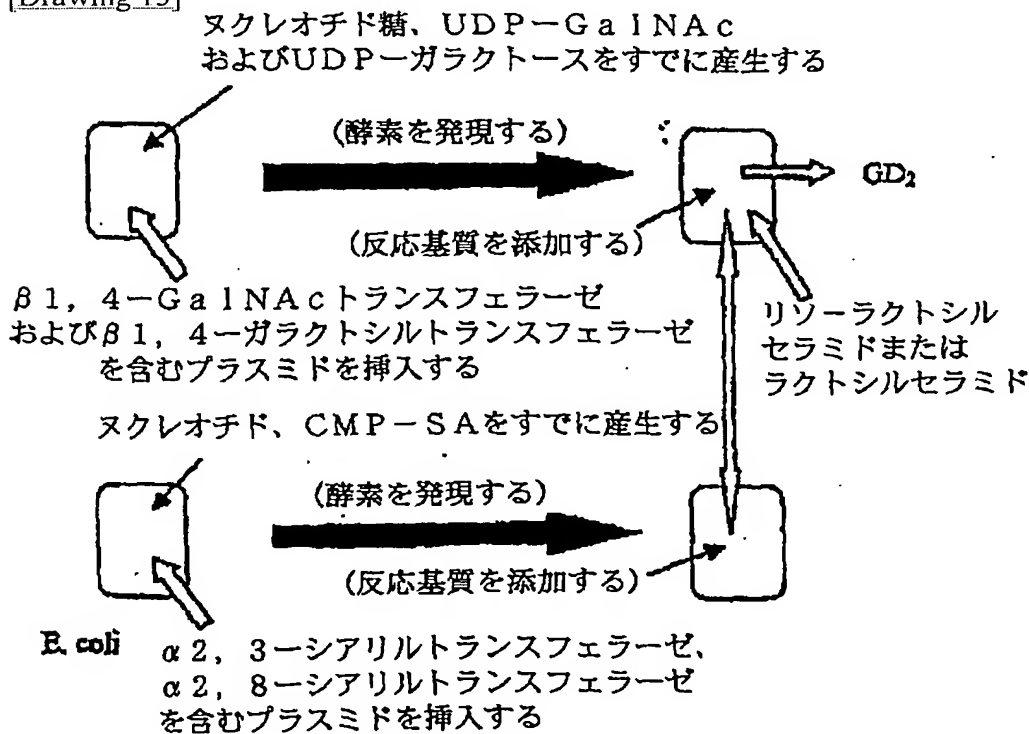


[Drawing 12]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

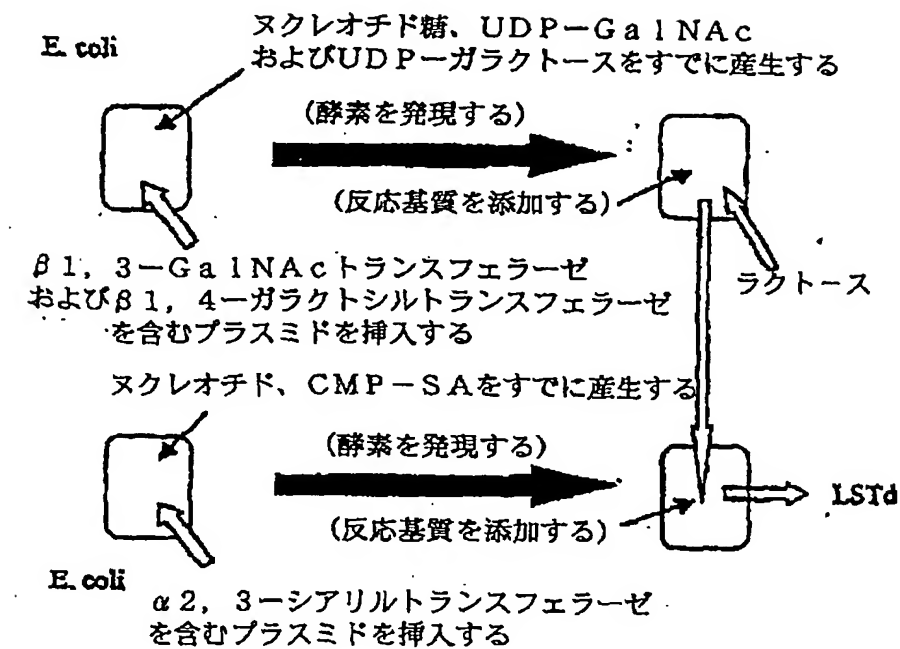


[Drawing 13]

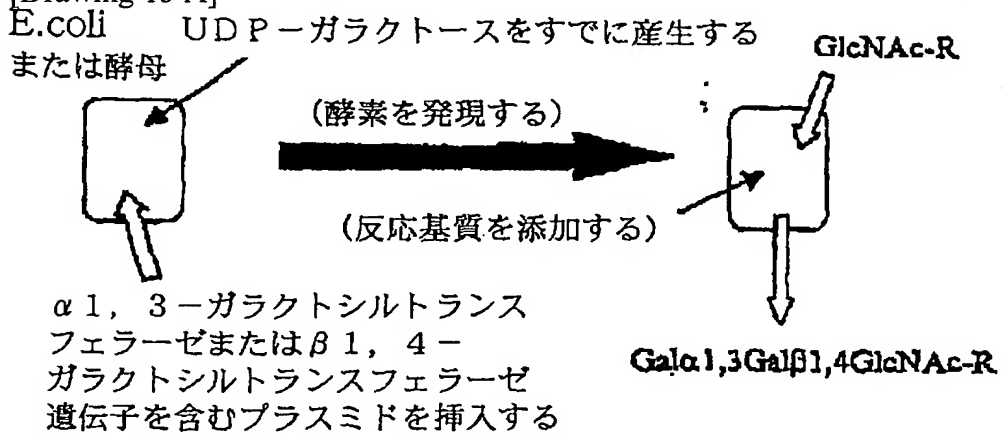


[Drawing 14]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

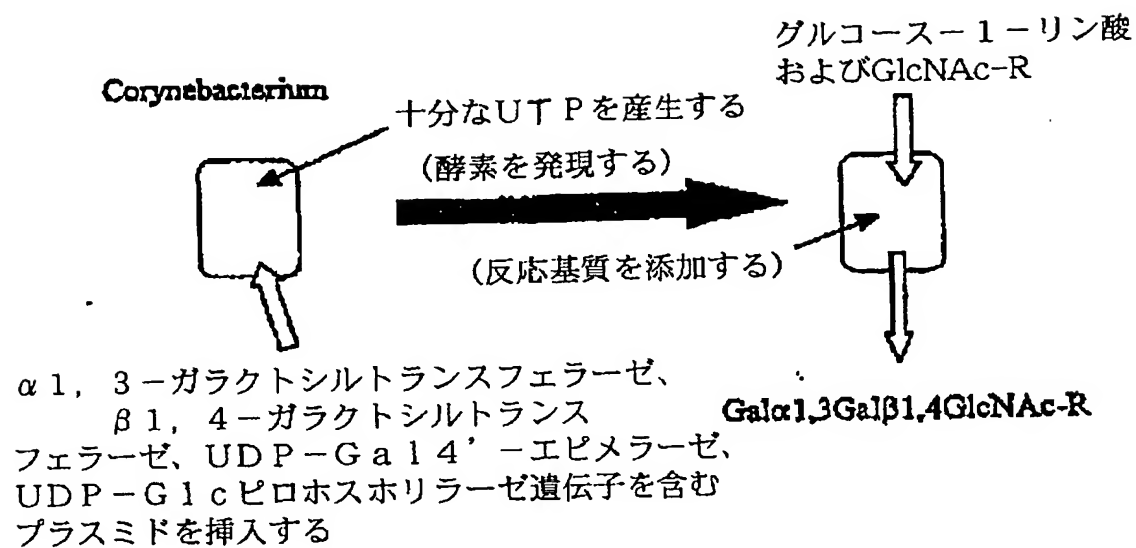


[Drawing 15 A]



[Drawing 15 B]

THIS PAGE BLANK (USPTO)



[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)